

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Interactions virus-hôte: Implication de la protéine
cellulaire Upfl au niveau de la régulation de l'ARN du
VIH-1

par

Lara Ajamian

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

Avril, 2007

© Lara Ajamian, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Interactions virus-hôte: Implication de la protéine
cellulaire Upf1 au niveau de la régulation de l'ARN du
VIH-1

Présenté par:

Lara Ajamian

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Ali Ahmad (président-rapporteur)

Dr. Andrew J Mouland (directeur de recherche)

Dr. Hugo Soudeyns (membre du jury)

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Des études récentes de notre laboratoire ont mené à l'identification de l'incorporation de la protéine Upf1 dans la particule virale. De plus, Upf1 a été identifiée dans le complexe RNP du VIH-1 avec Staufen1 et Upf1 a été immunoprécipitée avec pr55^{Gag}. Upf1 est impliquée dans divers processus qui contrôlent le sort de l'ARN dans les cellules comme son épissage, sa traduction, son transport et sa dégradation, en particulier lors de la dégradation des ARNm qui contiennent des CPTs (codons de terminaison prématurée). Nous avons proposé l'hypothèse qu'Upf1 pourrait jouer un rôle primordial dans la stabilité et/ou la surveillance de l'ARN du VIH-1. Pour examiner la fonction d'Upf1, nous avons diminué le niveau intracellulaire d'Upf1 par la méthode d'interférence à l'ARN. La diminution de la protéine Upf1 a engendré une perte significative de l'ARN, de pr55^{Gag} et de particules virales, même si l'activité d'Upf1 sur les ARNm contenant un CPT a été mise en évidence. De plus, la surexpression d'Upf1 a provoqué une augmentation de l'expression des ARNs et de protéines virales du VIH-1. Les niveaux de protéines virales peuvent être récupérés en utilisant un vecteur Upf1 insensible au siRNA utilisé, mais pas les niveaux d'ARN, indiquant qu'Upf1 régule la traduction des ARNs du VIH-1. De plus, les effets d'Upf1 ne sont pas limités au compartiment cytoplasmique, ce qui indique qu'Upf1 est importante dans les phases tardives de la réplication virale, juste après la transcription. Nous avons démontré des rôles distincts d'Upf1 sur l'ARN du VIH-1 et dans le mécanisme NMD ('Nonsense-mediated mRNA decay'). Nos résultats démontrent pour la première fois qu'Upf1, une protéine de l'hôte, fonctionne pour maintenir la stabilité des ARNs du VIH-1 et est une composante clé du RNP du VIH-1.

Mots Clés : VIH-1, interactions virus-hôte, Upf1, NMD, régulation, ARN génomique, pr55^{Gag}.

SUMMARY

Recent studies in our laboratory identified the incorporation of Upf1 in viral particles. Moreover, Upf1 was identified in the HIV-1 RNP complex with Staufen and it was present in the immuno-complex with pr55^{Gag}. Upf1 is implicated in various processes involved in regulating the fate of cellular RNAs such as their splicing, translation, transport and degradation, particularly in the degradation of mRNAs containing pre-termination codons (PTCs). This led us to hypothesize that Upf1 could play an important role in HIV-1 RNA stability. In order to examine the function of Upf1 in the context of HIV, we decreased its levels via siRNA. The decrease in Upf1 resulted in a dramatic negative effect on HIV-1 RNA, pr55^{Gag} and virus production. Moreover, the overexpression of Upf1 resulted in their significant upregulation. The levels of pr55^{Gag} were rescued by using a Upf1 insensitive expressing plasmid to the siRNA treatment, but not the levels of RNA, indicating a role of Upf1 in translation of HIV-1 RNAs. Also, the effects of Upf1 are not limited to the cytoplasmic compartment, indicating that Upf1 is important during the late steps of HIV-1 expression, right after transcription. Our results show distinct roles of Upf1 on HIV-1 RNA stability and the NMD (Nonsense-mediated mRNA decay) mechanism. Moreover, our results show for the first time that Upf1, a cellular protein, functions to confer HIV-1 RNA stability, promotes its translation and is a key component of the HIV-1 RNP complex.

Key Words: HIV-1, virus-host interactions, Upf1, NMD, regulation, genomic RNA, pr55^{Gag}.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé en français	iii
Summary	iv
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiv
Publications	xv
 CHAPITRE 1: Introduction	 1
1.1 VIH-1: l'agent étiologique du SIDA	1
1.2 Structure et organisation du VIH-1	4
1.2.1 Structure de la particule virale – le virion mature	4
1.2.2 Le génome et les protéines virales	5
1.3 Cycle de réplication	8
1.3.1 Étapes précoces	9
1.3.2 Étapes tardives	11
1.4 Régulation de l'ARN du VIH-1	15
1.4.1 Organisation de l'ARN génomique du VIH-1	15
1.4.2 Protéines cellulaires impliquées dans la régulation des ARNs viraux	18
1.5 Upf1 (UpFrameshifting Protein 1)	23
1.5.1 Découverte, Structure et Caractérisation de la protéine Upf1	23
1.5.2 Les fonctions d'Upf1 et sa présence dans divers complexes	26
 Objectif du projet	 31
 CHAPITRE 2 : Matériels et Méthodes	 32

2.1 Anticorps	32
2.2 ARN interférences	32
2.3 Culture cellulaire	32
2.4 Clones proviraux	33
2.5 Les vecteurs Upfl et de contrôle	33
2.6 Transfection	34
2.7 Western Blot	34
2.8 Extractions d'ARN	35
2.9 Northern Blot	35
2.10 Immunoprécipitation	36
2.11 Fluorescence d'hybridation in situ	37
2.12 Analyse du cycle cellulaire	38
 CHAPITRE 3 : Résultats	 39
3.1 Diminution de l'expression intracellulaire d'Upfl par la technique d'interférence à l'ARN.	39
3.2 La diminution d'Upfl par siRNA n'induit pas une accumulation des cellules en phase S.	41
3.3 L'immunoprécipitation de pr55 ^{Gag} montre la présence d'Upfl dans le complexe avec pr55 ^{Gag} .	43
3.4 Effets de la modulation des niveaux intracellulaires d'Upfl sur la synthèse de pr55 ^{Gag} et de l'ARN génomique du VIH-1.	45
3.4.1 Niveaux de pr55 ^{Gag} suite à la modulation des niveaux d'Upfl.	45
3.4.2 Niveaux d'ARN génomique après la modulation des niveaux d'Upfl.	46
3.5 Le rôle d'Upfl pendant la réplication du VIH-1 diffère de son rôle dans le mécanisme NMD.	50
3.5.1 Les niveaux de l'ARNm TcR-β.	50

3.5.2 La surexpression d'une forme transdominante négative (TDN) d'Upfl augmente les niveaux de pr55 ^{Gag} et d'ARN génomique.	50
3.5.3 L'ARN génomique contenant un CPT n'est pas un substrat pour le mécanisme NMD.	53
3.6 L'expression d'Upfl peut restaurer la synthèse de pr55 ^{Gag} , mais pas les niveaux d'ARN génomique.	56
3.7 Les effets d'Upfl ne sont pas limités au compartiment cytoplasmique.	62
3.8 Le rôle d'Upfl est spécifique dans la régulation de l'ARN du VIH-1.	65
3.9 L'importance de certaines régions d'Upfl.	67
CHAPITRE 4 : Discussion et Conclusion	69
4.1 Importance d'Upfl dans la régulation de l'ARN du VIH-1	69
4.2 Modèle proposé	73
4.3 Perspectives	76
Liste des références	78

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Structure de la particule virale du VIH-1	4
Figure 1.2	Représentation du cycle de réplication du VIH-1	8
Figure 1.3	Organisation de l'ARN génomique du VIH-1	15
Figure 1.4	Comparaison d'Upfl chez la levure et les mammifères	24
Figure 1.5	Représentation schématique de la structure de la protéine cellulaire Upfl	26
Figure 1.6	Rôles de la protéine cellulaire Upfl dans la cellule	27
Figure 3.1	Diminution du niveau intracellulaire d'Upfl par la technique d'interférence à l'ARN (siRNA)	40
Figure 3.2	Analyse du cycle cellulaire, trente heures et quatre jours après traitement des cellules avec siUpfl	42
Figure 3.3	Upfl forme un complexe protéique avec pr55 ^{Gag}	44
Figure 3.4	L'expression d'Upfl est essentielle pour le mécanisme NMD et pour la stabilité de l'ARN du VIH-1	47
Figure 3.5	La diminution du niveau intracellulaire d'Upfl réduit la synthèse de pr55 ^{Gag} et de l'ARN génomique dans les souches M (macrophage)-tropiques	49
Figure 3.6	Augmentation de l'ARN génomique avec un mutant transdominant négatif d'Upfl	52
Figure 3.7	Le mécanisme NMD ne reconnaît pas l'ARN génomique contenant un CPT	54
Figure 3.8	L'expression de Flag-UpflR rétablit la synthèse de pr55 ^{Gag} , mais pas les niveaux d'ARN génomique	58
Figure 3.9	L'importance de l'expression d'Upfl à différents temps sur les niveaux de pr55 ^{Gag} et d'ARN du VIH-1	60
Figure 3.10	Effet de la diminution du taux intracellulaire d'Upfl sur l'ARN génomique du VIH-1 dans différents compartiments cellulaires	63
Figure 3.11	Spécificité d'Upfl sur la stabilité de l'ARN génomique	66

Figure 3.12	La surexpression de certains mutants d'Upf1 ne stabilise pas l'ARN génomique comme le type sauvage	68
Figure 4.1	Modèle proposé du rôle d'Upf1 au sein du cycle de réplication du VIH-1	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Rôles des protéines virales dans la réplication du VIH-1	7
Tableau II	Listes des séquences INS/CRS et CES dans le génome viral, plus précisément dans les gènes <i>gag</i> , <i>pol</i> et <i>env</i>	17
Tableau III	Listes des protéines cellulaires jouant un rôle dans le cycle de réplication du VIH-1	19

LISTE DE ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMD	ARE-mediated mRNA decay
ARE	AU-rich elements
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer
CA	Protéine de capsid du VIH-1
CCL	Changement de cadre de lecture
CDK9	Cycline dépendante kinase 9
CES	Cis-enhancing sequence
CPT	Codons de terminaison prématurée
CRM1	Chromosome region maintenance 1
CRS	Cis-repressor sequence
CTD	Domaine C-terminal
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule grabbing nonintegrin
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DIS	Site d'initiation de la dimérisation
DRB	5,6-Dichlorobenzimidazole riboside
ECL	Enhanced chemiluminescence
EF-1 α	Facteur d'élongation 1 alpha
eIF5A	Eukaryotic initiation factor 5A
EJC	Complexe jonction exon-exon
Env	Protéine enveloppe du VIH-1
FACS	Cytométrie en flux
HAART	Highly active anti-retroviral therapy
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
hRIP	Human Rev-interacting protein
HTLV-III	Human T-cell Leukemia virus-III
ICAM	Intercellular adhesion molecules

IN	Protéine intégrase du VIH-1
Ini1	Integrase interactor 1
INS	Instability sequence
IR	Inverted repeats
kb	Kilobase
LAV	Lymphadenopathy-associated virus
LFA-1	Leucocyte function associated molecule 1
LTR	Long terminal repeats
MA	Protéine de matrice du VIH-1
ug	Microgramme
uL	Microlitre
nM	Nanomolaire
mL	Millilitre
mg	Milligramme
NC	Protéine nucléocapside du VIH-1
Nef	Protéine régulateur négatif du VIH-1
NES	Signal d'exportation nucléaire
NLS	Signal de localisation nucléaire
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay
ORF	Cadre de lecture
PBS	Tampon saline-phosphate
PBS	Site de liaison de l'amorce
PIC	Pre-integration complex
Pol	Polymérase
PPT	Polypurine tract
PR	Protéine protéase du VIH-1
Pr55 ^{Gag}	Précurseur polyprotéique de Gag
Pr160 ^{Gag-Pol}	Précurseur polyprotéique de Gag-Pol
Psi	Signal d'encapsidation du VIH-1
P-TEFb	Facteur de transcription et d'élongation positif b
Rab	Ras-associated small GTPases

Rev	Protéine régulateur d'expression protéique du VIH-1
RHA	ARN hélicase A
RNP	Complexe ribonucléoprotéique
RRE	Élément de réponse à Rev
RSE	RSV stability element
RSV	Rous sarcoma virus
RT	Protéine réverse transcriptase du VIH-1
RTC	Reverse transcriptase complex
SBS	Staufen binding site
SD	Splice donor
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
siRNA	Small interfering RNA
SMD	Staufen-mediated mRNA decay
SU	Protéine de surface du VIH-1
TAR	Élément de réponse à la transactivation
Tat	Transactivateur de la transcription
TDN	Transdominant negative
TM	Protéine transmembranaire du VIH-1
TRBP	TAR-RNA binding protein
Tsg 101	Tumor susceptibility gene 101
TTP	Tristetraprolin
Upf	UpFrameshifting protein
UTR	Région non traduite
U3	Région Unique 3'
U5	Région Unique 5'
VAN	Virion associated matrix interacting protein
Vif	Facteur d'infectivité virale du VIH-1
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLP	Virus like particles
Vpr	Protéine virale R du VIH-1
Vpu	Protéine virale U du VIH-1

REMERCIEMENTS

J'aimerais premièrement remercier plusieurs personnes qui m'ont permis d'accomplir ma maîtrise. Mon directeur de recherche, Dr. Andrew J. Mouland, qui m'a guidé dans le monde de la recherche avec sa confiance, son support scientifique et ses conseils. De plus, j'aimerais remercier le Dr. Andrew J. Mouland pour son soutien salarial provenant du IRSC. Un grand merci à nos collaborateurs Niels Gehring et Andreas Kulozik pour des discussions et supports scientifiques ainsi que leurs générosités pour des matériels essentiels pour ce projet. J'aimerais remercier davantage l'ensemble du laboratoire, passé et présent, surtout Levon et Kim, pour leur soutien scientifique et leur amitié.

J'ai eu la chance, durant ces deux ans, de former de très bonnes amitiés. J'aimerais remercier spécialement Guerline, non seulement pour les discussions scientifiques et une très bonne amitié, mais surtout pour ton aide et support. Je remercie aussi Heather et Susan. I thank all three of you for your moral support during difficult times and the laughs we have shared are memories I will always remember.

Je suis reconnaissante envers la Dre. Anne Gatignol et les membres de son laboratoire, Aïcha, Kaithlin, Carlos, Sébastien et Sylvanne ainsi que Fernando, Cédric, Mathieu, Maureen et Ariel pour des discussions scientifiques, mais plus précisément pour vos amitiés et tous les rires partagés.

There are three important people I would like to thank the most, my parents and my sister. Mom and Dad, your constant guidance, support, and encouragement led me to this accomplishment; I know I was difficult at times. Tamar, there are no words to describe how your support has helped me through these two years, especially the last three months.

THANK YOU ALL!

PUBLICATIONS

1. Ajamian L., Abrahamyan L., Milev M., Kulozik AE., Gehring NH., Mouland AJ. Upfl regulates Human Immunodeficiency virus type 1 RNA Metabolism and Translation. (Manuscrit en préparation).
2. Abrahamyan L., et al. (Manuscrit en préparation).

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Dans ce chapitre, je discuterai brièvement de l'historique, de la transmission, de la pathogénèse, des thérapies et de la mise au point de nouveaux traitements anti-rétroviraux. Ensuite, je vais décrire le cycle de réplication du virus et les ARNs viraux. De plus, je vais discuter le rôle de plusieurs protéines cellulaires impliquées dans le cycle réplcatif du VIH-1. Finalement, je décrirai la protéine cellulaire Upf1.

1.1 VIH-1: l'agent étiologique du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise)

À travers les siècles, beaucoup de maladies ont affligé l'humanité, mais aucune d'elles n'a eu un si grand impact que le SIDA. La première mention de cette maladie a été faite à l'automne 1981 où cinq patients ont été diagnostiqués avec une infection au *Pneumocystis carinii* et plusieurs autres infections rares généralement associées à des sujets présentant une grande défaillance immunitaire ¹, revu dans la référence ². Aujourd'hui, près de 26 ans plus tard, près de 40.3 millions de personnes à travers le monde vivent avec le VIH-1³ et l'épidémie a déjà fait près de 25 millions de victimes², principalement dans la région sub-saharienne du continent africain ².

Ce nouveau syndrome a d'abord été appelé GRID ('gay-related immune deficiency syndrome'), parce qu'il semblait préférentiellement cibler la communauté homosexuelle ⁴. Cependant, très vite, il a été clair que ce syndrome ciblait également les hémophiles, les utilisateurs de drogues injectables, les hétérosexuels et pouvait aussi être transmis durant les transfusions sanguines. Le virus a aussi été nommé LAV ('Lymphodenopathy-associated virus') ⁵ et HTLV-III ('Human T-Cell leukemia virus type III') ⁶. Finalement, après plusieurs analyses, le virus a définitivement été nommé virus d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) ⁷. Quelques années plus tard, un second virus a été découvert ayant des similarités génétiques (40%) et est référé par VIH-2 ^{4,8}. Toutefois, la seule distinction entre ces deux est que le VIH-1 est responsable de la pandémie du SIDA, alors que le VIH-2

n'est endémique que dans quelques pays de l'Afrique de l'Ouest. Les deux virus conduisent vers le SIDA, mais le VIH-2 semble être moins agressif que le VIH-1⁹.

Le VIH-1, l'agent étiologique du SIDA, est classé dans la famille des *Rétroviridae* et appartient au genre *Lentivirus*. Ces virus sont caractérisés par une réplication lente et une longue période d'incubation (phase latente).

Il existe trois modes de transmission du virus: la transmission verticale (mère-enfant), par le sang, et finalement par contact sexuel, ce dernier étant le plus commun¹⁰. Les cellules ciblées principalement sont les lymphocytes T CD4+ et les macrophages, mais d'autres cellules du système immunitaire, comme les cellules de Langerhans, dendritiques, lymphocytes B et les astrocytes, peuvent être également infectées⁴.

Dans la plupart des cas, l'infection par le VIH-1 évolue vers le développement du SIDA. Le cours de l'évolution vers le SIDA a été divisé en plusieurs phases. Après l'infection initiale, il y a apparition des anticorps dirigés contre le virus¹¹. Dans cette phase de primo-infection, chez environ 50% des patients, des symptômes apparentés à ceux de la grippe apparaissent¹². Les symptômes disparaissent généralement après deux semaines, ce qui rend l'infection difficile à diagnostiquer. Après la primo-infection vient ensuite une longue phase asymptomatique qui varie entre 3 et 10 ans. Il est à noter que, durant cette phase, le virus continue de se répliquer et contribue à une destruction continue des cellules CD4+. Durant cette période, les sujets demeurent infectieux et peuvent contribuer à la propagation du virus. Les symptômes apparaissent quand le système immunitaire n'est plus capable de remplacer les cellules lymphocytaires CD4+ détruites par le virus, ce qui mène à un décompte CD4 inférieur à 500 cellules/ μ L. Durant cette phase asymptomatique, la virémie augmente avec la chute des cellules T CD4+ et il y a alors l'apparition des infections opportunistes et néoplasies¹³. Le diagnostic de SIDA se fait lorsque le compte de cellules T CD4+ tombe en dessous de 200 cellules/ μ L. Les infections opportunistes sont causées par des parasites (*Toxoplasma*,

Leishmania), des bactéries (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*), des champignons (*Pneumocystis carinii*, *Candida*) ou des virus (*Herpès* comme *Cytomegalovirus*). Avec l'effondrement du système immunitaire, chez les sidéens, ces infections sont difficilement traitables et souvent mortelles. L'apparition de certains cancers comme les sarcomes de Kaposi et les lymphomes, est aussi commune. La démence et les encéphalites sont aussi d'autres complications du SIDA^{13,14}.

Depuis la découverte du VIH-1 au début des années 1980, environ une vingtaine de médicaments antirétroviraux ont été développés¹⁵. En 1987, la monothérapie a été utilisée comme traitement pour ralentir le cycle de réplication du virus¹⁶. Mais ce traitement s'est très vite avéré inefficace en raison de l'apparition de mutations au sein du génome viral qui permettent au virus d'échapper à l'action du médicament. L'apparition de mutations de résistance est principalement causée par la réplication virale élevée et le fait que la transcriptase inverse (l'ADN polymérase du virus) n'a pas d'activité correctrice, ce qui donne lieu à une erreur tous les 10000 nucléotides incorporées durant la reverse transcription¹⁷. La trithérapie, HAART (*'Highly Active Anti-Retroviral Therapy'*), est la combinaison de trois médicaments antirétroviraux ou plus. Ce traitement réduit la charge virale en augmentant la quantité des cellules T naïves et CD4+ mémoires¹⁸. La raison principale de la réduction de la charge virale est le fait qu'avec la combinaison de trois médicaments, il est plus difficile pour le virus d'acquérir trois mutations de résistance. Néanmoins, les patients en développent tout de même. Avec l'augmentation des souches virales résistantes contre les médicaments disponibles actuellement, la recherche de nouvelles cibles augmente. Présentement, plusieurs chercheurs se concentrent à mieux comprendre les interactions entre le virus et la cellule hôte afin de cibler les interactions de nature cellulaire. Cette approche pourrait mener à de nouvelles stratégies thérapeutiques, puisqu'il sera plus difficile pour le virus de développer des résistances contre les protéines cellulaires dont il a besoin pour survivre.

1.2 Structure et organisation du VIH-1

1.2.1 Structure de la particule virale- le virion mature

Les particules virales (Figure 1.1) sont caractérisées par une enveloppe bicouche lipidique provenant de la membrane de la cellule hôte, acquise lors de leur bourgeonnement. La protéine de l'enveloppe du virus (Env) est ancrée dans la bicouche et forme une structure trimérique formée de deux glycoprotéines: la protéine de surface (gp120) et la protéine transmembranaire (gp41) ^{19,20}.

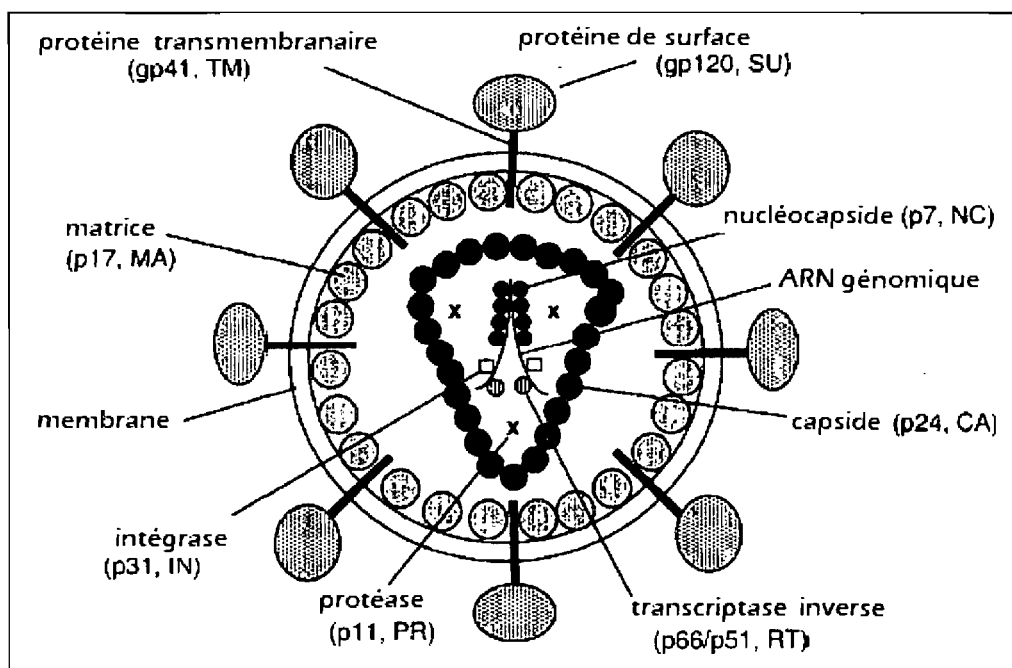


FIGURE 1.1: Structure de la particule virale du VIH-

1. Les protéines virales de surface et celles à l'intérieur du virion sont indiquées. TM: protéine transmembranaire, SU: protéine de surface, NC: nucléocapside, CA: capsid, RT: transcriptase inverse, PR: protéase, IN: intégrase, MA: matrice. Figure adaptée de ²⁴ avec permission.

En dessous de l'enveloppe se trouve la protéine de la matrice (p17, MA) qui elle-même entoure la protéine de la capsid (CA, p24). La capsid, de forme conique, contient le génome viral ainsi que certaines protéines virales et cellulaires. Le génome viral est composé de deux copies identiques de l'ARN génomique qui sont unies de manière non covalente. La protéine de nucléocapside (NC, p7) est associée à ce dimère d'ARN pour le protéger de divers processus cellulaires ²¹. Seules les protéines virales Vpu, Rev et Tat ne sont pas incorporées dans les virions. Les autres protéines, telles que la protéase (PR, p12), la transcriptase inverse (RT, p66 et p51), l'intégrase (IN, p32), la protéine p6, le peptide p2, le peptide p1 et les protéines accessoires Vpr, Nef et Vif sont présentes dans les particules virales ^{22,23}. Plusieurs protéines cellulaires sont aussi incorporées dans les particules virales. Cet aspect sera approfondi un peu plus loin.

1.2.2 Le génome et les protéines virales

Le génome viral du VIH-1 est un transcrit de 9 kb comportant des régions codantes et non codantes. Les deux régions non codantes sont aux extrémités 5' et 3' et ces régions flanquent les régions codantes. L'organisation génomique du VIH-1 sera discutée en plus de détails dans la section 1.4.

Le génome code pour 15 protéines virales. Ces protéines sont synthétisées à partir d'une trentaine d'ARNm différents qui sont produits par épissage alternatif ^{24,25}. Le génome contient 9 cadres de lecture ouverts, dont trois communs à tous les rétrovirus: gag, pol et env ²⁴. Ces trois gènes codent pour les protéines structurales et enzymatiques, alors que les autres cadres de lecture codent pour les protéines régulatrices et accessoires.

Le gène *gag* ('group-specific antigen') exprime un précurseur polyprotéique nommé Pr55^{Gag}. Ce précurseur est clivé par la protéase virale pour produire les

protéines de la capside (CA-p24), la matrice (MA-p17), la nucléocapside (NC-p7), la protéine p6 et les peptides p1 et p2.

Le gène *pol* (polymérase) encode le précurseur polyprotéique Pr160^{Gag-Pol} provenant d'un changement de cadre de lecture -1 par rapport à Gag. Ce décalage est un événement rare (seulement 5% du temps) et donne lieu à un ratio Pr55^{Gag}/Pr160^{Gag-Pol} de 20:1²⁶. Ce ratio est important car il est critique pour l'infectivité du virus²⁶. Le clivage de ce précurseur génère les protéines enzymatiques, soit la protéase (PR-p10), l'intégrase (IN-p32) et la reverse transcriptase (TR-p55/p66).

Le gène *env* (enveloppe) produit le précurseur gp160, mais diffère des deux précurseurs précédents puisqu'il est clivé par une protéase cellulaire pour produire les glycoprotéines de surface (SU-gp120) et transmembranaire (TM-gp41)^{24,25}.

Les protéines régulatrices et accessoires sont encodées par les six autres gènes. Les deux protéines régulatrices sont Tat ('Transactivator of Transcription') et Rev ('Regulator of Virion Expression'). Nef ('Negative Factor'), Vif ('Viral Infectivity Factor'), Vpu ('Viral Protein U') et Vpr ('Viral Protein R') sont les protéines accessoires^{22,27}.

Les protéines régulatrices et la protéine accessoire Nef sont transcrites à partir de l'ARN multi-épissé de 2 kb, alors que les trois autres protéines accessoires et la protéine virale Env sont codées par l'ARN mono-épissé de 4 kb. L'ARN génomique non-épissé de 9 kb génère les protéines structurales du précurseur polyprotéique Pr55^{Gag} et les protéines enzymatiques²².

Le Tableau I indique les fonctions connues de chacune des protéines virales.

Protéines Virales		Fonctions Connues
Pr55 ^{Gag}		Importante pour maintenir la structure des virions.
	MA	Rôle dans l'assemblage; facilite l'infection des cellules qui ne se différencient pas (exemple : macrophages); rôle dans l'import nucléaire.
	CA	Importante dans l'oligomérisation de Gag; forme la capside des particules virales.
	NC	Se lie au signal d'encapsidation psi et dirige l'ARN génomique pour son assemblage; multimérisation de Gag.
	P6	Importante pour le bourgeonnement.
RT		ADN polymérase ARN/ADN dépendante (ARN → ADN).
PR		Importante dans la maturation des particules virales. Clive les précurseurs polyprotéiques à l'exception de la protéine gp120.
IN		Importante pour l'intégration de l'ADN proviral dans la cellule cible.
Env		Importante pour l'attachement et la fusion des virions.
Tat		Activateur de la transcription virale. Lie la région TAR (' <u>T</u> rans <u>a</u> ctivation <u>R</u> esponse <u>E</u> lement').
Rev		Lie la région RRE (' <u>R</u> ev <u>R</u> esponsive <u>E</u> lement'). Rôle dans l'exportation des ARNs 9kb et 4kb. Rôle dans la traduction.
Vpr		Arrête le cycle cellulaire en phase G2. Importante dans l'importation du PIC (' <u>P</u> re- <u>I</u> ntegration <u>C</u> omplex') dans le noyau.
Vpu		Dégrade le récepteur CD4 et augmente la relâche des particules virales.
Vif		Facilite l'infectivité.
Nef		Régule négativement le récepteur CD4 et le complexe MH1 (CMHI). Importante dans la pathogénèse du virus.

**TABLEAU I: Rôles des protéines virales dans la
réplication du VIH-1. Adapté de**

22,23,24,27

1.3 Cycle de Réplication

Le cycle de réplication viral du VIH-1 comporte plusieurs étapes qui sont principalement divisées en deux : étapes précoces et tardives. C'est l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte qui les sépare ²⁴.

Le cycle réplcatif du virus est démontré dans la Figure 1.2.

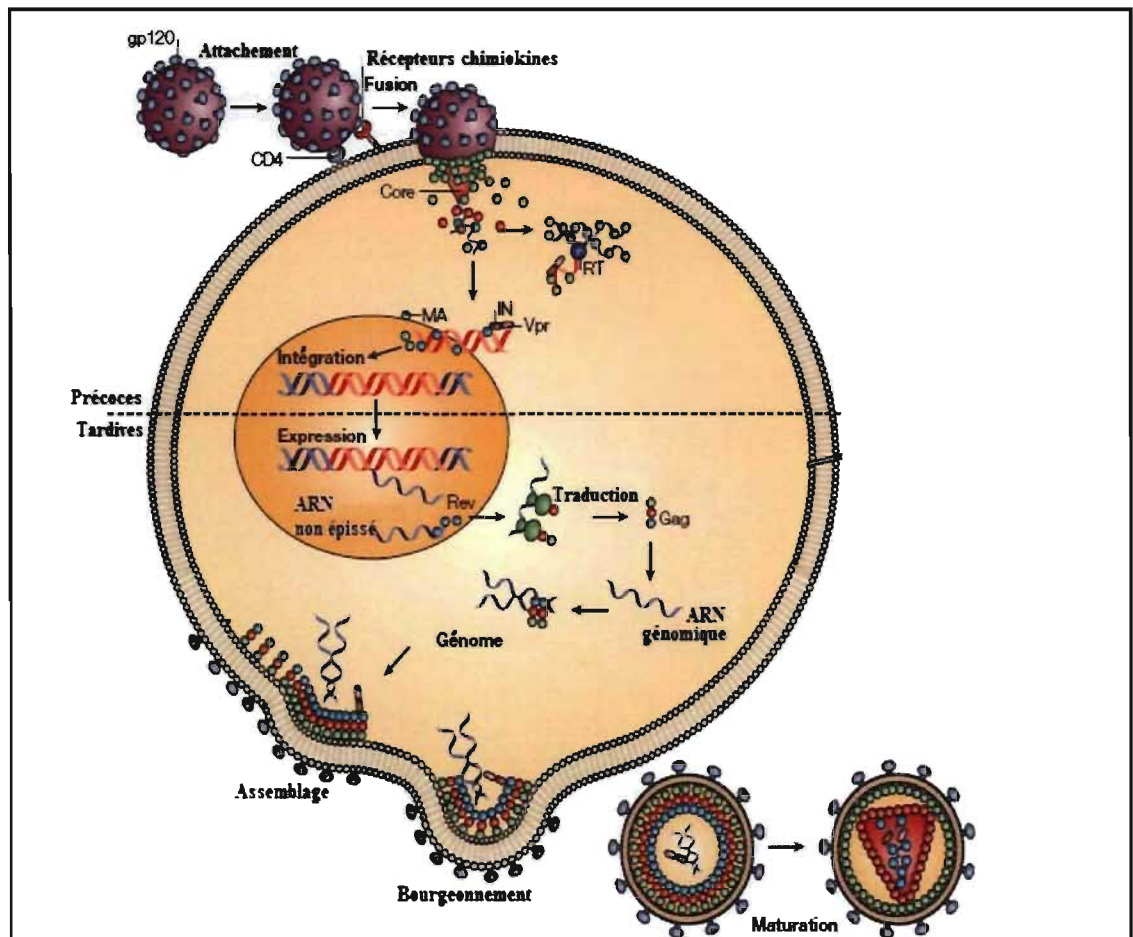


FIGURE 1.2 : Représentation du cycle de réplication du VIH-1.

Les glycoprotéines transmembranaire et de surface interagissent avec le récepteur CD4 et avec un des corécepteurs (CCR5 ou CXCR4). Cette interaction engendre la fusion des deux membranes. Ensuite, il y a décapsidation du virus et la reverse transcription prend place pour

générer l'ADN proviral. L'ADN proviral et les protéines virales IN, MA et Vpr forment le complexe de pré-intégration (PIC), qui est par la suite transporté au noyau. Dans le noyau, l'ADN proviral s'intègre dans le génome de la cellule hôte. La transcription débute et génère les ARNs viraux. Rev permet la translocation des ARNs pleine longueur et mono-épissés du noyau au cytoplasme, alors que les ARNs multi-épissés diffusent librement dans le cytoplasme. Les protéines virales sont alors synthétisées et se dirigent vers la membrane cellulaire pour l'assemblage des virions. L'ARN génomique se localise aussi à cet endroit. Suite au recrutement de certaines protéines cellulaires, il y a alors bourgeonnement, relâche et maturation des virions. RT: Réverse transcriptase, IN: intégrase, MA: matrice, Vpr: 'Viral Protein R'. Voir le texte pour plus de détails. Figure adaptée de ⁵⁷ avec permission.

1.3.1 Étapes précoces

La **fixation**, qui est la première étape précoce, est basée sur la reconnaissance spécifique entre la surface de la cellule cible et le virus. La glycoprotéine de surface gp120 (SU) se lie au récepteur cellulaire CD4 donnant lieu à un changement de conformation. Suite à ce changement de conformation de gp120, de nouveaux sites de liaisons sont exposés, ce qui lui permet d'interagir avec un des co-récepteurs (CXCR4 ou CCR5) ²⁴. Une région variable de gp120, appelée V3, dicte le choix du co-récepteur et cette nouvelle interaction détermine le tropisme cellulaire. Le corécepteur CXCR4 est utilisé par les souches T-tropiques (X4 - lymphocytes T), alors que les souches M-tropiques (R5 - Macrophage) utilisent le corécepteur CCR5 ^{24,28}. Cette interaction déclenche un second changement de conformation au niveau de la glycoprotéine transmembranaire gp41, ce qui résulte en la fusion des membranes virale et cellulaire. Les interactions du récepteur et du co-récepteur avec gp120 et gp41 sont absolument nécessaire à l'étape de fusion ²⁴.

D'autres récepteurs cellulaires (DC-SIGN, ICAM-1, LFA-1) peuvent aussi jouer un rôle dans l'attachement du virus à la cellule hôte ⁴⁶. Bien que la voie d'entrée par fusion décrite ci-haut est la plus commune et la plus productive, le virus peut aussi pénétrer les cellules hôtes par transfert direct, endocytose des puits de clathrines ou synapse virologique ²⁹.

Suite à l'attachement du virus et la fusion des membranes, la capside **pénètre** dans le cytoplasme de la cellule cible. Une fois dans le cytoplasme, il y a dissociation rapide de la capside. Ce processus de **décapsidation** n'est pas très bien défini. Des études démontrent que plusieurs facteurs menant à la libération du matériel génomique jouent un rôle important, notamment, la phosphorylation des protéines de matrice par les MAP kinases ³⁰ et la protéine cellulaire cyclophiline A ³¹. Ce désassemblage libère un complexe nucléoprotéique appelé complexe de transcription inverse ('Reverse Transcription Complex', RTC) ²⁴. Ce complexe ARN/protéines comprend entre autres les protéines virales MA, NC, RT, IN et Vpr, le matériel génomique ²⁴ et la protéine cellulaire ARNt^{lys3} synthétase ^{22,24}.

La transcription inverse convertit l'ARN génomique viral en ADN proviral double brin ²⁴. Trois activités de la protéine virale RT, enzyme caractéristique des rétrovirus, sont importantes à l'étape de transcription inverse: l'activité ADN polymérase ARN et ADN dépendante et l'activité ARNase H ²². La rétrotranscription est fortement régulée et utilise plusieurs éléments qui agissent en *cis* du génome viral. L'ARNt^{lys3} sert d'amorce pour l'initiation de la transcription du brin (-) de l'ADN. Ensuite, l'ARN est dégradé par l'activité ARNase H et le second brin (+) d'ADN est synthétisé. ²⁴

L'ADN proviral double brin et les protéines virales MA, IN, Vpr et RT forment le complexe de pré-intégration ('Pre-Integration Complex' - PIC) . Les protéines virales MA, IN et Vpr sont importantes car elles possèdent des séquences NLS ('Nuclear Localization Signal') qui interagissent avec les protéines

transporteuses importine α et β ^{32,33,34}. Aussi, ces protéines virales et l'ADN flap sont importants pour la translocation du PIC au noyau ²⁴.

Suivant le **transport nucléaire** du PIC du cytoplasme au noyau, la protéine virale intégrase est requise pour l'étape d'**intégration**. L'intégration de l'ADN proviral dans la cellule hôte débute avec la reconnaissance des régions LTRs (3' et 5'), plus spécifiquement les régions IR ('Inverted Repeats') par l'intégrase ³⁵. Cette dernière catalyse un clivage dinucléotidique sur l'ADN proviral et, en même temps, clive l'ADN de l'hôte. Cela est suivi d'une transestérification entre les extrémités des deux ADNs. Il y a alors intégration de l'ADN proviral dans celui de l'hôte ²⁴. Cette dernière étape précoce nécessite les protéines cellulaires Ini1 ('Integrase Interactor 1'), HMG-I, BAF, Ku70, Ku80, ATM et aussi la protéine virale NCp7 ^{36, 37}. L'intégration de l'ADN proviral ne se fait pas au hasard. Elle prend place préférentiellement dans des régions contenant des gènes actifs puisque l'ADN proviral nécessite la machinerie cellulaire pour être exprimé sous forme de provirus ³⁸, revu dans la référence ³⁹. De plus, l'ADN proviral peut intégrer la même cellule hôte dans plusieurs régions de son génome ⁴⁰. L'intégration marque la fin des étapes précoces du cycle réplcatif du virus.

1.3.2 Étapes tardives

Dépendant du site d'intégration, la **transcription** des gènes viraux peut débiter ou non. À ce stade, il peut y avoir une phase de latence d'une durée indéfinie. La latence est établie lorsque l'ADN proviral s'intègre dans une zone d'hétérochromatine qui est transcriptionnellement silencieuse, lorsqu'il y a un manque de facteurs cellulaires ou l'absence de la protéine virale Tat ⁴¹. La transcription des gènes viraux peut être divisée en deux étapes : en absence de la protéine Tat et en présence de cette dernière.

Quand Tat n'est pas présente, la machinerie de transcription de l'hôte est essentielle. L'ARN polymérase cellulaire II initie la transcription en se liant aux LTRs. Les LTRs contiennent des séquences en *cis* qui sont essentielles pour la synthèse d'ARN. L'absence de Tat engendre un faible niveau de transcription, mais suffisant pour synthétiser assez d'ARNs viraux qui seront ensuite épissés^{22,24,42}. Ces transcrits multi-épissés ne contiennent pas de signal inhibiteur INS/CRS ('Instability Sequences/Cis-Repressor Sequences') et sont alors transportés dans le cytoplasme de façon indépendante. Seuls les transcrits non-épissés et multi-épissés contiennent des séquences CRS/INS⁴³. Ces transcrits multi-épissés sont traduits pour générer les protéines de régulation Tat et Rev et la protéine accessoire Nef. Après une accumulation suffisante de ces protéines, Tat et Rev retournent au noyau.^{22,24}

Dans le noyau, la protéine Tat augmente significativement la transcription en se liant à la région TAR du LTR. Suite à cette liaison, le facteur P-TEFb (facteur de transcription et d'élongation positif b – 'Positive Transcription Elongation Factor b') est recruté. La CDK9 ('Cyclin Dependent Kinase 9') et la cycline T1 font partie du facteur P-TEFb. Le recrutement de ce facteur engendre la phosphorylation du CTD ('C-Terminal Domain') de l'ARN polymérase II par CDK9. Cela augmente l'activité de la polymérase et la transcription⁴⁴, revu dans la référence²⁴. La transcription et **l'épissage alternatif** créent trois transcrits: non-épissés, mono-épissés et multi-épissés. Les ARNs non-épissés (9 kb) codent pour les protéines structurales et enzymatiques et sont ceux qui sont encapsidés dans les virions. Les ARNs mono-épissés (4 kb) expriment les protéines accessoires Vif, Vpr, Nef, Vpu et Env. Les protéines Tat, Rev et Nef sont exprimées par les ARNs multi-épissés de 2 kb²².

Les premiers transcrits traduits sont les ARNs multi-épissés de 2 kb. Ils sont transportés de façon indépendante du noyau au cytoplasme. Le **transport** des ARNs non-épissés et mono-épissés nécessitent absolument la protéine virale Rev. Rev est synthétisée par les ARNs multi-épissés et circule du noyau au cytoplasme grâce à la présence des signaux NLS ('Nuclear Localisation Signal') et NES ('Nuclear Export Signal'). La séquence NLS se lie à un élément en *cis* nommé RRE qui est présent sur

les deux transcrits de 9 kb et 4 kb. Cet élément de réponse à Rev se trouve dans le gène *env*^{22,24,43,45}. Environ huit molécules de Rev se lient à cette séquence²⁴. Ensuite, le complexe Rev/RRE interagit avec la machinerie cellulaire d'export nucléaire grâce à la présence du NES²⁴. De cette manière, Rev transporte les ARNs du noyau au cytoplasme pour la traduction ou, dans le cas de l'ARN non-épissé, pour servir d'ARN génomique (encapsidation). Ce complexe d'export cellulaire contient les protéines cellulaires CRM-1 et exportin-1^{43,63}. Par la suite, Rev retourne au noyau (*via* son NLS) pour transporter d'autres ARNs non- et mono-épissés jusqu'au moment où assez de protéines structurales, enzymatiques et accessoires auront été produites^{22,24}.

D'autres protéines cellulaires, dont hRIP ('Human Rev-Interacting Protein'), Rab ('Ras-Associated Small GTPases') et Nup98, forment un intermédiaire entre Rev et Crm1²². La protéine cellulaire Sam68 interagit aussi avec Rev pour stabiliser le complexe d'export nucléaire. Des études ont démontré que Sam68 peut substituer la fonction navette de Rev⁴⁷. Les protéines cellulaires eIF5A ('Ekaryotic Initiation Factor 5A'), DDX1, DDX3⁴⁸, et hnRNPs⁴⁹ sont aussi impliquées dans l'étape d'export nucléaire des ARNs pleine longueur et mono-épissés.

Au fur et à mesure que les ARNs sont transportés au cytoplasme, il y a **traduction** des protéines virales. **L'assemblage** débute lorsque les ARNs sont exportés au cytoplasme et quand la quantité de protéines virales traduites est suffisante. La protéine virale Pr55^{Gag} est la protéine clé de cette étape^{24,50}. Des études ont démontré que cette protéine seule peut engendrer la formation et le bourgeonnement de VLP ('Virus-Like Particles')^{24,50}.

La membrane plasmique cellulaire est le site de l'assemblage de la structure des virions immatures. Suite à sa traduction, Pr55^{Gag} se dirige vers les radeaux lipidiques ('lipid rafts') sur la membrane plasmique⁵¹. Sa fixation est médiée par la région M ('Membrane targeting domain') qui se trouve sur le domaine MA⁵². Ce domaine MA contient une région myristylée en N-terminal formée d'acides aminés

basiques, ce qui crée une charge nette positive^{22,24}. Étant donné que la surface de la membrane plasmique est chargée négativement (en raison de la présence des acides phospholipidiques) il y a formation d'une interaction électrostatique^{22,24,53}. La prochaine étape est la multimérisation de Pr55^{Gag}, où intervient le domaine I ('Interaction domain')⁵². Ce domaine contient une partie de CA et de NC. La région RMH est extrêmement importante, car elle est responsable de la multimérisation de Pr55^{Gag}²².

La région NC de Pr55^{Gag} contient deux doigts de zinc qui sont impliqués dans le processus d'encapsidation de l'ARN génomique⁵⁰, revu dans les références^{22,24}. Plus spécifiquement, c'est l'interaction entre le domaine NC de Pr55^{Gag} et la séquence psi (signal d'encapsidation) sur l'ARN génomique qui caractérise l'étape d'encapsidation. La dimérisation de l'ARN génomique se fait entre les régions DIS ('Dimer Interaction Structure' – site d'initiation de la dimérisation) de ce dernier. Par la suite, les protéines Env, par l'intermédiaire du domaine MA, sont incorporées⁵⁰.

L'avant dernière étape dans le cycle réplcatif du virus est le **bourgeonnement**. Cette étape implique le domaine p6 de Pr55^{Gag}, aussi nommé région tardive L ('Late domain'), et plus spécifiquement le motif PTAP^{22,24,52,54}. Son interaction avec la protéine cellulaire Tsg101 facilite ce processus⁵⁵. La région C-terminale interagit aussi avec la protéine virale Vpr, ce qui résulte en son incorporation dans la particule virale²².

La dernière étape est la **maturation** des particules virales, un phénomène important pour l'infectivité du virus. La maturation est initiée durant le bourgeonnement. La protéine virale protéase est essentielle pour ce processus. Dans la particule virale immature, la liaison dimérique entre les précurseurs GagPol engendre l'autoclivage de la protéase⁵⁶. Ensuite, cette dernière va cliver les précurseurs polyprotéiques Pr55^{Gag} et Pr160^{GagPol} pour générer les protéines structurales et enzymatiques^{22,24}. L'ordre de clivage est important. La maturation est caractérisée par l'apparition de la forme conique de la capsidie donnant lieu à des

changements dans la morphologie des virions et créant alors la particule virale infectieuse.

1.4 Régulation de l'ARN du VIH-1

1.4.1 Organisation de l'ARN génomique du VIH-1

L'ARN génomique du VIH-1 (Figure 1.3) est très complexe. Il comporte des caractéristiques semblables aux ARNs cellulaires, comme par exemple la structure cap en 5' (Gppp) et la queue de poly(A) en 3' ⁴⁹. Cet ARN est constitué de deux régions non codantes, situées aux extrémités 5' et 3', qui flanquent les séquences codantes. Dans ces régions non codantes se trouvent la plupart des séquences régulatrices qui sont impliquées dans les diverses étapes du cycle de réplication du VIH-1.

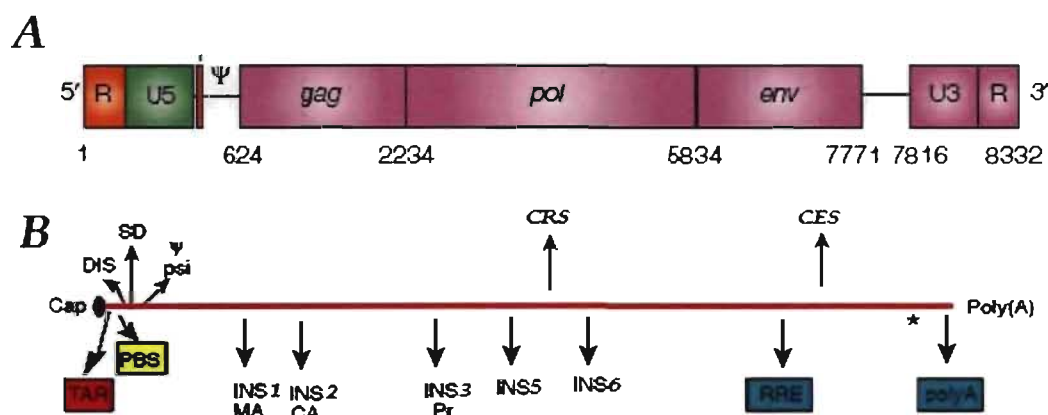


FIGURE 1.3: Organisation de l'ARN génomique du VIH-1.

L'ARN génomique comprend un cap en 5' et une queue poly(A) en 3'. Le génome comprend 2 régions noncodantes aux extrémités (R-U5, U3-R) qui flanquent les régions codantes. Les trois gènes (régions codantes) de l'ARN génomique sont *gag*, *pol* et *env*. Le génome contient plusieurs séquences importantes dans

la réplication du VIH-1, comme TAR (Élément de réponse à la transactivation), DIS (Site d'initiation de la dimérisation), SD ('Splice Donor'), psi (signal d'encapsidation), PBS (site de liaison de l'amorce) et RRE (Élément de réponse à Rev). Les séquences INS/CRS ('Instability Sequences/Cis-Acting Repressive Sequences') et CES ('Cis Enhancing Sequences') sont aussi indiquées. Voir le texte et le Tableau II pour plus de détails. Figure adaptée de ^{49,57} avec permission.

La région 5' non codante peut être divisée en quatre parties : la région R ('Repet'), U5 ('Unique 5'), PBS ('Primer Binding Site' – site de liaison de l'amorce) et L ('Lead'). Cette région comporte plusieurs séquences agissant en *cis*, telles que les régions TAR, PBS, DIS et psi.

La région répétée (R) est composée de deux motifs : TAR et le signal de polyadénylation AAUAAA ⁵⁹. La séquence TAR est importante pour l'activation de la transcription des gènes viraux et constitue le site de liaison de la protéine virale Tat ⁵⁸. La région unique en 5' (U5) est la première séquence transcrite lors de la rétrotranscription du génome. La séquence PBS sert de site d'appariement de l'amorce, qui est l'extrémité 3' partiellement déroulée de l'ARNt^{lys3}, ce qui est important pour l'initiation de la reverse transcription ⁶⁰. La dernière région 5' non codante, la séquence Leader, est importante lors de la dimérisation (DIS), l'encapsidation (Psi) et l'épissage de l'ARN (SD). Cette séquence contient aussi le site d'initiation de la traduction des polyprotéines Gag et GagPol (AUG).

Les régions U3' ('Unique 3') et R forment la séquence 3' non codante. Ces deux régions sont identiques à leur contrepartie en 5'. Le génome viral, la région codante, code pour les gènes *gag*, *pol*, *env*, ainsi que pour les protéines régulatrices et accessoires (décrit dans la section 1.2.1).

Deux régions riches en purines, dénommées PPT ('PolyPurine Tract'), situées en amont de la région U3 ⁶¹ et dans le gène *pol* ⁶², sont aussi présentes dans le génome viral. La première est relativement résistante à l'action de l'ARNase H, qui médie la dégradation de l'ARN durant la transcription du brin négatif d'ADN et sert d'amorce lors de la synthèse du second brin d'ADN ⁶¹. La seconde région PPT est importante dans la transcription inverse ⁶². La dernière séquence non codante est celle du changement de cadre de lecture (CCL) qui se trouve entre les gènes *gag* et *pol* et permet la synthèse des protéines enzymatiques.

D'autres éléments non codants intragéniques importants dans la régulation de l'expression des gènes viraux sont les séquences CRS ('Cis-Acting Repressive Sequences') ⁶⁴⁻⁶⁷, aussi appelées INS ('Instability Sequences') ⁶⁴⁻⁶⁷ ou CES ('Cis Enhancing Sequences') ⁶⁸, et RRE ('Rev Responsive Element') ^{22,24,43,45}. Ces séquences ont des fonctions importantes dans la stabilisation, le transport nucléocytoplasmique et la traduction des protéines virales ^{64-68,72,80}. Les éléments INS/CRS et CES, qui sont riches en nucléotides AU ⁶⁹⁻⁷⁰ (sauf RRE ⁷¹⁻⁷²) se trouvent au sein des gènes *gag*, *pol* et *env* (Tableau II).

Gène <i>gag</i>	INS1(p17gag) et INS2
Gène <i>pol</i>	INS3, INS5, INS6 et CRS
Gène <i>env</i>	RRE (n'est pas AU riche), CES

TABLEAU II: Listes des séquences INS/CRS et CES dans le génome viral, plus précisément dans les gènes *gag*, *pol* et *env*. RRE (Élément de réponse à Rev), INS/CRS ('Instability Sequences/Cis-Acting Repressive Sequences') et CES ('Cis Enhancing Sequences'). Voir le texte pour plus de détails. Adapté de ^{71,73-78}.

L'élément CES est présent dans le gène *env*, plus précisément dans la région de gp41 ^{68,79}. Cet élément régulateur augmente de façon significative l'expression

des protéines Gag. Des études ont démontré que cette séquence stabilise les ARNs. Sa présence augmente aussi les niveaux d'ARNs non- et mono-épissés dans le cytoplasme ^{68,79}.

L'élément RRE qui fait partie du gène *env*, une autre séquence qui agit en *cis*, est le site de liaison de la protéine Rev. Il se retrouve seulement sur les ARNs non- et mono-épissés, et permet leur transport du noyau au cytoplasme par la voie CRM1 dépendante ^{22,24,43,45,63}. De plus, en favorisant le transport de ces ARNs, la traduction de ces ARNs augmente aussi ⁸⁰. Des études ont aussi démontré que la liaison de REV au RRE stabilise ces ARNs ^{81,82}. Les ARNs qui dépendent de ce transport ne sont pas exprimés en l'absence de Rev en raison de la présence des séquences INS/CRS dans les gènes *gag*, *pol* et *env*. De plus, Rev est incapable de transporter les ARNs qui non pas un INS/CRS fonctionnel ^{74,80}. Ainsi, les régions INS/CRS sont importantes dans la régulation du transport des ARNs par la protéine Rev. En absence de Rev, ces ARNs sont confinés dans le noyau, ce qui peut conduire à leur dégradation et les sensibilise à la machinerie d'épissage. D'autres études montrent que Rev augmente l'association des ARNs qui contiennent la région RRE avec les polysomes, jouant ainsi un rôle dans la traduction ^{71,81,82}.

D'autre part, les éléments INS/CRS régulent négativement l'expression des protéines virales. Des études ont démontré que le remplacement des résidues AU de ces éléments augmentent significativement l'expression des protéines des gènes *gag*, *pol* et *env*, de même que les niveaux de leur ARNm ⁷¹. Plusieurs protéines cellulaires interagissent avec ces éléments régulateurs dans le génome viral. La section prochaine en décrit quelques unes.

1.4.2 Protéines cellulaires impliquées dans la régulation des ARNs viraux

Depuis la découverte du VIH-1, beaucoup d'études ont été poursuivies dans le but de comprendre le rôle des protéines cellulaires de surface et celles incorporées dans les particules virales. Plusieurs protéines cellulaires interviennent dans plusieurs

étapes du cycle de réplication du virus, mais ne sont pas incorporées dans les virions. Le Tableau III montre quelques unes de ces protéines importantes dans les interactions virus-hôte. L'identification et la caractérisation de nouvelles protéines cellulaires au sein du VIH-1 pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Protéines cellulaires	Fonctions cellulaires	Incorporée	Partenaire viral
Actine	Protéine du cytosquelette	Oui	NC
APOBEC3G	Désaminase	Oui	Vif, NC
CCR5	Récepteur chimiokine	Non	Gp120
CD4	Récepteur	?	Gp120, Vpu
Cofiline	Déstabilise les filaments d'actine	Oui	
CRM1	Rôle dans le transport nucléocytoplasmique	?	Rev (NES)
Cyclophiline A	Peptidylprolyl cis-trans isomérase, immunophiline	Oui	CA
CXCR4	Récepteur chimiokine	Non	Gp120
DC-SIGN	Protéine de surface, récepteur lectinique	Oui	Gp120
DDX1,3,5	Impliquées dans l'épissage, l'export nucléaire et traduction des ARNs	?	ARN
EF1 alpha	Facteur de traduction, se lie à actine, chaperonne, ubiquitine hydrolase	Oui	MA, NC
EIF5 alpha	Facteur d'initiation de la traduction; cofacteur de transport Rev-dépendant	?	Rev
GAPDH	Glycolyse, se lie aux ARNt	Oui	

HLA classe II	Restriction CMH II	Oui	
HnRNP A/B (hnRNP A1 ⁸⁹)	Facteur d'épissage et transport nucléocytoplasmique des ARNs	Non	ARN
HP68	Protéine se liant à l'ATP	Oui	Gag, NC, Vif
HSP70	Protéine de chaperonne de repliement protéique	Oui	Gag
ICAM-1	Se lie à LFA-1	Oui	Gp120
Ini1	Non déterminée	Oui	IN
KSRP ⁸⁸	Lie les séquences riches en AU	?	ARN
LFA-1	Se lie à ICAM-1	Oui	
PABP1 ⁸²	Se lie au site poly(A), rôle dans la traduction et la stabilisation des ARNs	?	ARN(INS/CRS)
PSF ⁸⁰	Se lie à PPT	?	ARN(INS/CRS)
Purl alpha	Transcription et transport des ARNs	?	Tat/Tar
PTB/hnRNPI ⁸⁹	Rôle dans la traduction de EMCV en se liant à IRES	?	ARN(INS/CRS)
RHA	Rôle dans l'épissage et le transport des ARNs	Oui	Gag
Sam68	Se lie à l'ARN	?	RRE
Staufen1	Transport d'ARN	Oui	NC, gARN
TRBP	Importante pour le mécanisme d'ARNi, régule la protéine cellulaire PKR	Non	TAR
Tsg101	Transport protéique, régulateur d'ubiquitination	Oui	P6Gag
TTP ⁷⁰	Interagit avec régions riches en AU et engendre leur dégradation	?	ARN (INS/CRS)
VAN	Non déterminée	Oui	MA, Nef

TABEAU III: Listes des protéines cellulaires jouant un rôle dans le cycle de réplication du VIH-1. Adapté de 29,36,84-87.

Plusieurs protéines cellulaires sont présentes à la surface des virions, comme par exemple le HLA de classe II, les ICAMs et les LFAs. Des études ont démontré que la présence des protéines ICAMs et HLA de classe II augmentent l'infectivité du virus^{46,86}.

Certaines protéines cellulaires sont présentes à l'intérieur des particules virales, telles que Staufen1, Ini1 et APOBEC3G. Des études menées dans notre laboratoire ont démontré que la modulation du niveau intracellulaire de Staufen1 engendre des changements dans son encapsidation et celle de l'ARN génomique. De plus, Staufen1 se lie directement avec le précurseur polyprotéique pr55^{Gag}^{90,91}.

Ini1, qui appartient à la famille des 'Tumor Suppressors', interagit directement avec l'intégrase virale^{36,86,92}. Des études ont démontré que la diminution des niveaux intracellulaires de cette protéine engendre une diminution de la production de virions et de l'infectivité^{86,92}. Ces résultats suggèrent qu'Ini1 a un rôle à jouer dans l'assemblage du VIH-1⁹², revu dans la référence 86.

La protéine cellulaire APOBEC3G est un facteur de restriction qui a une fonction cytidine désaminase ce qui génère des mutations au niveau des ARNs⁹³. Alors que la plupart des protéines cellulaires encapsidées dans les virions sont recrutées par des facteurs viraux, Vif s'associe directement avec APOBEC3G pour minimiser son incorporation dans les particules virales⁴⁶. Vif diminue le niveau intracellulaire d'APOBEC3G en la dirigeant vers la machinerie cellulaire de dégradation par le protéasome. En absence de Vif, APOBEC3G est incorporée dans les particules virales, interagit avec l'ARN génomique et catalyse la désamination des cytosines en uraciles (C→U) sur le brin négatif lors de la transcription inverse⁹⁴. Ensuite, lorsque le brin positif est synthétisé, des nucléotides A sont insérées aux

sites désaminées, ce qui crée des hypermutations (G→A) et inactive le virus ³⁶. Aussi, la présence d'uracile au sein de l'ADN néo-synthétisé peut conduire au recrutement d'enzymes de réparation conduisant à la dégradation de l'ADN³⁶.

D'autres protéines cellulaires sont importantes durant la réplication virale, mais ne sont pas incorporées dans les particules: hnRNPA1 ⁸⁹, PABP1 ⁸², PTB/hnRNPI ⁸⁹, PSF ⁸⁰, KSRP ⁸⁸ et TTP ⁷⁰. Ces protéines cellulaires interagissent avec les éléments AU riches du génome viral.

La protéine cellulaire hnRNPA1 interagit avec la séquence CRS ^{89,95} et CES ⁷⁹. De plus, notre équipe a démontré que la diminution du niveau intracellulaire de hnRNPA1 amène à une diminution de la protéine cellulaire pr55^{Gag} ⁹⁶. À son tour, PABP1 se lie à la séquence INS-1 ⁸², alors que PTB/hnRNPI interagit avec la séquence CRS ⁸⁹. Un modèle propose que la liaison de ces trois protéines cellulaires à l'ARN au niveau des éléments INS/CRS/CES *in vitro* divertissent les ARNs contenant des introns (non- et mono-épissés) de l'épissage et promouvoient leur association avec Rev, ce qui permet leur export hors du noyau et leur expression ⁸⁰.

La protéine cellulaire PSF interagit directement avec l'INS qui est situé dans le gène *gag* ⁸⁰. Cette interaction réduit le niveau des ARNs contenant les éléments INS/CRS. Il n'y a par conséquent aucune production virale ⁸⁰. Zolotukhin *et al.* ont proposé que PSF est une protéine clé qui médie la régulation posttranscriptionnelle du VIH-1.

TTP et KSRP sont des protéines cellulaires qui interagissent directement avec les séquences AU riches dans le génome viral. TTP diminue la production des virions en augmentant l'épissage ⁷⁰, alors que KSRP diminue la réplication virale en ciblant les ARNs non- et mono-épissés du VIH-1 vers la dégradation ⁸⁸. Ces deux protéines jouent des rôles essentiels dans la dégradation des ARNs riche en AU par la voie des exosomes ⁹⁷. Cette machinerie de dégradation de l'exosome sera discutée d'avantage dans la prochaine section.

1.5 Upf1 (Upframeshifting protein 1)

1.5.1 Découverte, Structure et Caractérisation de la protéine Upf1

La protéine Upf1 a initialement été identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et joue un rôle primordial dans la dégradation des ARNs aberrants (décrit en détail ci-contre) ⁹⁸.

La protéine Upf1 humaine (Upf1) et celle de la levure sont des hélicases ATPases ARN dépendante ¹⁰¹ et montrent 58% de similarité dans la région centrale mais divergent à leurs deux extrémités ^{99,100}. La figure 1.4 montre la comparaison des séquences d'Upf1 humaine et de levure ¹⁰⁰.

Upf1, une phosphoprotéine ¹⁰² majoritairement cytoplasmique ¹⁰³, consiste de 1118 acides aminés ¹⁰⁵. Des études ont démontré que cette protéine s'accumule dans le noyau suivant un traitement avec la leptomycine B, ce qui indique qu'elle est aussi une protéine navette ¹⁰⁴. Plusieurs travaux ont également montré que son transport nucléocytoplasmique est médié par CRM1 ¹⁰⁴. Elle a des fonctions ATPase et hélicase, et peut se lier aux NTPs et aux ARNs ^{101,102}. Elle est exprimée dans tous les tissus mais à des concentrations différentes. Pal *et al.* (2001) ¹⁰² ont démontré qu'Upf1 était distribuée également parmi les fractions de polysomes, subpolysomes et ribosomes-libres dans les cellules HeLa. De plus, ils ont montré que la phosphorylation d'Upf1 était sensible au traitement de wortmannin et, à un moindre degré, au traitement par la rapamycine.

La région conservée comprennent deux doigts de zinc riches en cystéine et sept domaines hélicases ¹⁰⁰ (Figure 1.5). Le rôle des deux doigts de zinc n'est pas connu. Applequist *et al.* suggèrent que ces deux doigts de zinc pourraient être des régions de liaison des ARNs simple ou double brin, et pourraient aussi faciliter l'interaction entre Upf1 et les ribosomes ¹⁰⁰. De plus, ce groupe a montré que ces

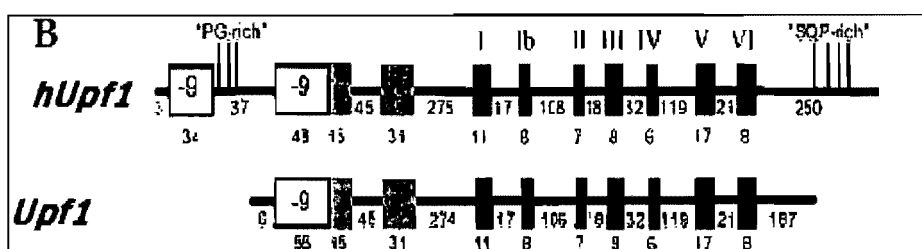
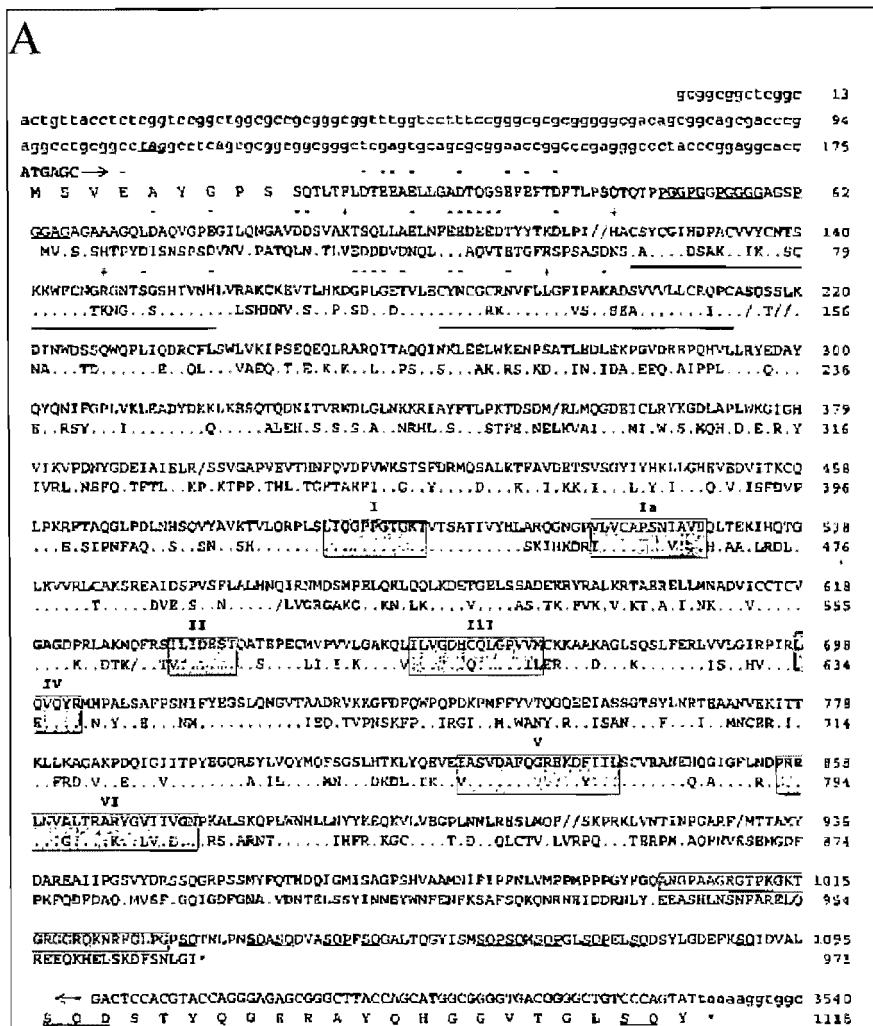


FIGURE 1.4: Comparaison d'Upf1 chez la levure et les mammifères. (A) Les numéros de droite indiquent les positions des nucléotides et des acides aminés. Les régions transcrites sont en majuscule et celles non transcrites sont en minuscule. Les régions soulignées sont riches en

sérine/glutamine (SQ) et sérine/glutamine/proline (SQP). Les deux doigts de zinc sont soulignés en gras et les boîtes grises numérotées sont les domaines hélicases. (B) Les deux doigts de zinc sont les boîtes grises et les boîtes blanches indiquent les régions acidiqes. Les boîtes noires identifient les domaines hélicases. Figure adaptée de ¹⁰⁰avec permission.

deux doigts de zinc riche peuvent favoriser la reconnaissance des séquences d'instabilité sur les ARNs localisés en amont des codons aberrants ^{100,107}. L'activité ATPase de cette protéine réside dans les domaines hélicases Ia et II ¹⁰⁶. L'ATP est un cofacteur important et sa présence permet l'interaction avec les ARNs ¹⁰¹. Des études ont démontré que cette interaction avec l'ARN est médiée par le domaine hélicase VI ¹⁰⁶. Aussi, les souris KO pour Upf1 meurent durant le stade embryonnaire ¹⁰⁸. Le domaine C-terminal de la protéine contient plusieurs répétitions de sérine/glutamine (SQ) et de sérine/glutamine/proline (SQP) ^{106,109}. Ces résidues sérines jouent un rôle dans sa phosphorylation ^{106,109}. D'autres part, la région N-terminale, qui contient des régions riches en proline et glycine, est impliquée dans la déphosphorylation d'Upf1 ^{106,110}. Ces deux extrémités, qui ne sont pas présentes chez la levure (Figure 1.4), sont importantes dans le cycle de phosphorylation et de déphosphorylation d'Upf1. Upf1 est phosphorylée par les kinases PIKK ATR, ATM et SMG1, et déphosphorylée *via* le complexe SMG5/SMG7/PP2A et SMG6 ¹⁰⁹⁻¹¹². Des signaux d'export (NES) ou de localisation (NLS) conventionnels n'ont pas été identifiés dans Upf1, mais certaines régions spécifiques pourraient posséder une activité NES (acides aminés 596-697) et NLS (acides aminés 55-416) ^{105,106}. Deux motifs qui sont absents de la protéine chez la levure sont les régions riches en glycine (PGGXG) en N-terminal, ainsi que les résidues acidiqes aux codons 1003-1029 ¹⁰⁰. La première pourrait faciliter les interactions protéines-protéines, ou protéines-ARNs, alors que la seconde ressemble à des motifs qu'on retrouve sur des domaines liant les ARNs ¹⁰⁰.

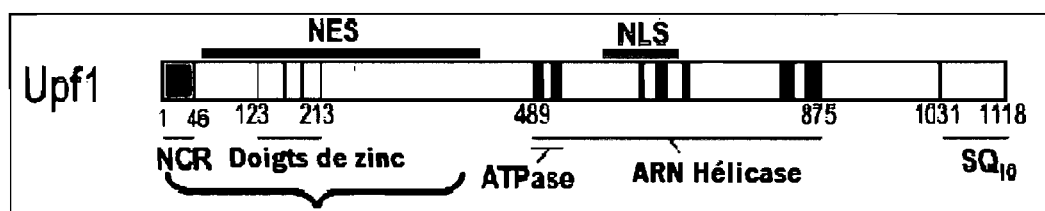


FIGURE 1.5: Représentation schématique de la structure de la protéine cellulaire Upf1. NCR est la région conservée en N-terminal. On peut voir les deux doigts de zinc et les 7 domaines ARN hélicases. Des régions qui peuvent être des signaux NES (signal d'exportation nucléaire) et NLS (signal de localisation nucléaire) sont indiquées. Figure adaptée de ¹⁰⁶ avec permission.

1.5.2 Les fonctions d'Upf1 et sa présence dans divers complexes

Upf1 interagit avec plusieurs protéines cellulaires et est impliquée dans la régulation du sort des ARNs dans les cellules, comme par exemple leur épissage, leur transport et leur traduction ¹¹³. Les divers rôles d'Upf1 dans les cellules sont démontrés dans la figure 1.6. Son rôle est très bien caractérisé dans la dégradation des ARNs aberrants (NMD, 'Nonsense Mediated mRNA Decay') ^{113-116,118,126}. Ce mécanisme est un des processus élaboré par la cellule afin de prévenir la synthèse de protéines tronquées causée par la présence des codons de terminaison prématurée (CPT). NMD est aussi impliqué dans la dégradation de plusieurs ARNm qui ne contiennent pas de CPTs, comme par exemple ceux des gènes des immunoglobulines (Ig) ¹¹⁷. Les trois protéines centrales du mécanisme sont Upf1, Upf2 et Upf3, mais la dégradation est déclenchée seulement suite au recrutement d'Upf1. Lors de la transcription de l'ADN, avant le transport nucléocytoplasmique, un complexe protéique dénommé EJC ('Exon Junction Complex') (335 kDa) lie l'ARNm 20 à 24 nucléotides en amont des jonctions exon-exon ¹¹⁵. Ensuite, lors de l'export nucléaire,

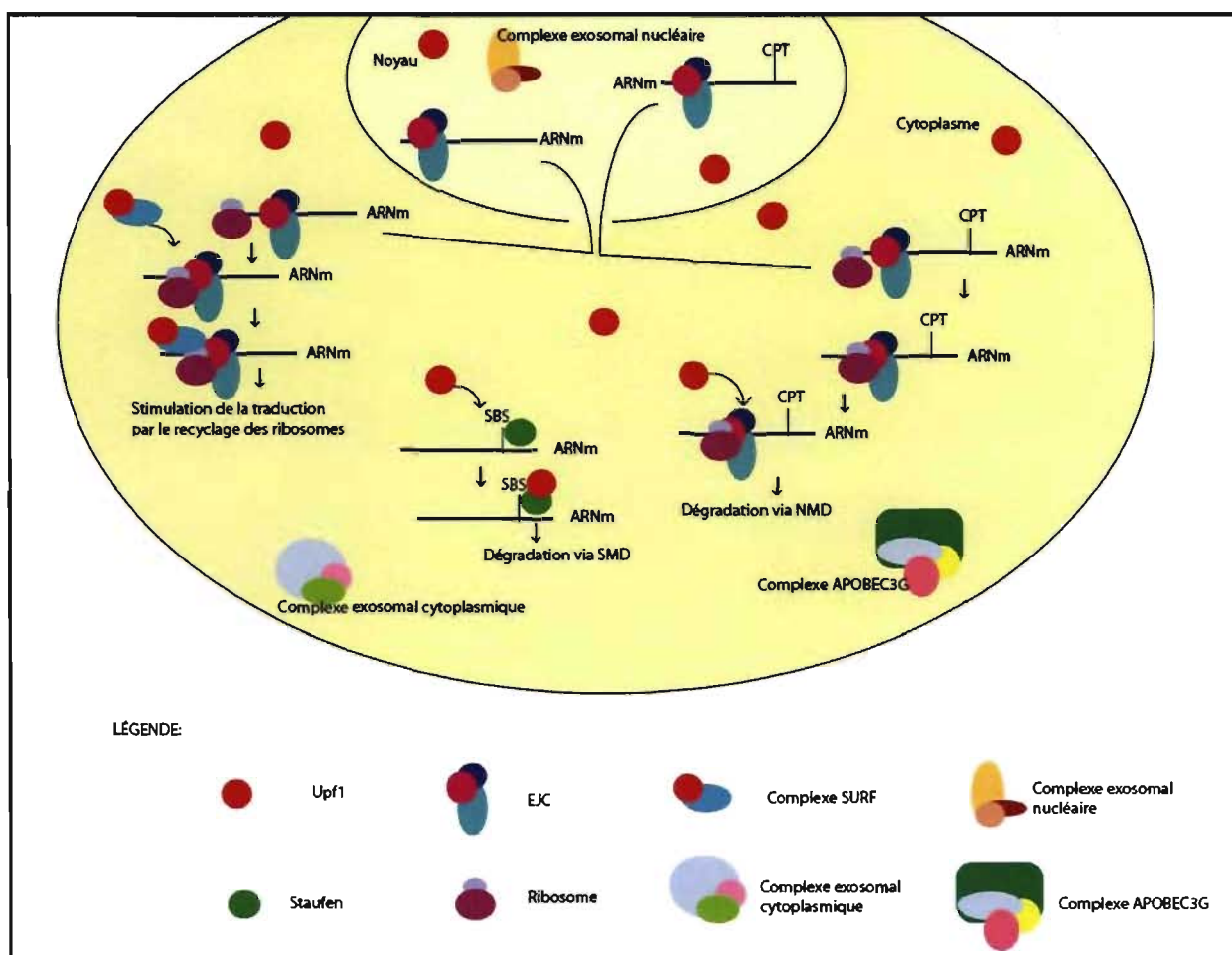


FIGURE 1.6 : Rôles de la protéine cellulaire Upf1 dans la cellule. Upf1 joue un rôle dans les mécanismes de dégradation SMD (‘Staufen-Mediated mRNA Decay’) et NMD (‘Nonsense-Mediated mRNA Decay’). De plus, Upf1 s’associe avec le complexe exosomal nucléaire et cytoplasmique. Elle est aussi présente dans la le complexe APOBEC3G et joue un rôle dans la stimulation de la traduction par le recyclage des ribosomes. CPT: codon de terminaison prématurée, SBS: ‘Staufen Binding Site’. Voir le texte pour plus de détails.

les protéines Upf3 et Upf2 s'associe à ce complexe. Lorsque l'ARNm se trouve dans le cytoplasme, il est lié au complexe EJC et Upf2/3. À ce stade-ci, deux scénarios sont possibles. Premièrement, si l'ARNm ne contient pas de CPT, les ribosomes s'associent à l'ARNm et initient la traduction. Lorsque les ribosomes atteignent le complexe EJC-Upf3-Upf2, ce dernier est dissocié et la traduction est complétée, permettant ainsi l'initiation d'un autre cycle. Les codons stop de la traduction sont reconnus par les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3^{114,116}. Dans le cas où il y a présence d'un CPT 50-55 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon, les ribosomes sont incapables de déplacer ce complexe et stagnent¹¹⁸. Upf1 et SMG1 sont ensuite recrutées par eRF1 et eRF3. Ce complexe, Upf1-SMG1-eRF1-eRF3, est nommé SURF^{114,116}. Par la suite, Upf1 interagit avec le complexe EJC-Upf2-Upf3 *via* Upf2 et il y a alors dégradation des ARNm aberrants^{114-116,118,126}. Le complexe SURF joue un rôle important dans la fidélité de la terminaison de la traduction et trace un lien entre la terminaison de la traduction et la stabilité des ARNs¹¹⁶.

Plusieurs groupes ont démontré que la diminution du niveau intracellulaire d'Upf1 ou la présence de mutants d'Upf1 qui sont défectueux pour NMD, comme par exemple TDN-R844C, stabilise des ARNm¹²¹. Le tiers des mutations responsables des pathologies ou des cancers est causé par la présence de CPT. Le NMD est donc un processus physiologiquement important pour la cellule. Une pathologie directement associée à ce mécanisme est la β -thalassémie¹²².

Ce mécanisme a aussi été caractérisé dans le contexte du rétrovirus RSV ('Rous Sarcoma Virus')¹²³⁻¹²⁵. L'ARN du RSV est sujet au NMD lorsqu'un CPT est introduit dans le cadre de lecture du gène *gag*^{123,124}. Ceci a amené à l'identification d'une séquence de stabilité présente sur l'ARN viral nommé RSE ('RSV Stability Element'). Le RSE pourrait servir à recruter des facteurs de stabilisation, comme les eRFs et PABP, afin de stabiliser l'ARN viral¹²⁵.

Upf1 joue aussi un rôle primordial dans le mécanisme SMD (‘Staufen-Mediated mRNA Decay’)¹²⁰. Une sous-population d’ARNm possède un site de reconnaissance SBS (‘Staufen Binding Site’) pour Staufen. Lorsque Staufen interagit avec ce site SBS, Upf1 est recrutée. Quand le complexe Staufen-Upf1 est situé en aval d’un codon de terminaison normale, l’ARNm est dégradé. Staufen interagit seulement avec Upf1, et non avec ses partenaires Upf2 ou Upf3. Il est important de noter que cette voie de dégradation posttranscriptionnelle n’est pas dépendante de la présence d’un codon de terminaison prématurée. Ainsi, selon ses besoins cellulaires, deux mécanismes de régulation des ARNs sont disponibles, soit la voie impliquant Upf2/Upf3^{113-116,118,126} et la voie médiée par Staufen¹²⁰.

Upf1 interagit aussi avec le mécanisme de dégradation AMD (‘ARE-Mediated Decay’)^{97,114,127}. Ce mécanisme recrute le complexe exosome ou s’associe directement avec les protéines ARE, comme AUF1/hnRNP – KSRP – TTP, ou par l’intermédiaire de l’ARN hélicase RHAU^{97,114,127}. Ce mécanisme a également été identifié chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ces protéines cellulaires interagissent avec les éléments qui sont riches en AU (ARE). Récemment, des études ont démontré un lien mécanistique entre NMD et AMD¹²⁸. Le groupe de Banihashemi *et al.* a identifié le gène AUF1/hnRNP comme étant une cible potentielle du mécanisme NMD¹²⁸. De plus, le groupe de Maquat *et al.* ont démontré qu’Upf1 est immunoprécipitée avec les protéines du complexe exosomal^{129,130}.

Upf1 est aussi impliquée dans la dégradation de l’ARNm de l’histone H2A¹³¹. De plus, le mécanisme NMD a été identifié comme étant impliqué dans la régulation de l’ARN *Xist*, un gène important dans la régulation des chromosomes X¹⁵⁶. Des études récentes ont aussi démontré la présence d’Upf1 dans un complexe avec APOBEC3G¹³². Aussi, Upf1 augmente la traduction et promeut le recyclage des ribosomes^{133,134}. Azzalin *et al.* ont démontré qu’Upf1 participe à la régulation du cycle cellulaire. La diminution du niveau intracellulaire d’Upf1 dans les cellules HeLa engendre, après quatre jours, un arrêt en phase S¹¹¹, revu dans la référence¹¹². De

plus, Upf1 est importante pour compléter la réplication de l'ADN et elle interagit avec l'ADN polymérase delta^{111,112,119}.

Il est donc évident qu'Upf1 joue un rôle important dans le métabolisme des ARNs.

OBJECTIFS DU PROJET

La protéine cellulaire Staufen1 a des rôles dans le transport de certains ARNs. De plus, sa présence a été identifiée dans les RNPs neuronales en présence des protéines motrices, régulatrices et des facteurs impliqués dans la traduction ⁸³. Des études ont démontré une interaction directe entre Barentz et Staufen1 ⁸³. Par la suite, Barentz a été identifiée dans le complexe EJC et des recherches menées par le groupe de Palacios *et al.* ont déterminé qu'elle était une composante clé, comme Upf1, dans le mécanisme NMD ⁸⁵. Des études de notre laboratoire ont identifié Upf1 dans les particules virales. Par spectroscopie de masse et par chromatographie d'affinité, Upf1 a été identifiée dans le complexe RNP du VIH-1 en présence de Staufen1. De plus, Upf1 a été précipitée avec pr55^{Gag}. D'autres études ont aussi démontré la présence d'Upf1 dans le complexe avec APOBEC3G. Le rôle d'Upf1 a également été caractérisé chez le rétrovirus RSV. Cela nous a amené à émettre l'hypothèse qu'Upf1 pouvait jouer un rôle primordial dans la stabilité et/ou la régulation de l'ARN du VIH-1. Mon projet de maîtrise était d'étudier l'effet de la modulation des niveaux intracellulaires d'Upf1 sur le métabolisme de l'ARN du VIH-1.

Le chapitre 3 décrit les résultats obtenus. Nous avons premièrement vérifié l'efficacité de l'interférence à l'ARN (siRNA) et regardé s'il n'y avait pas un changement dans le cycle cellulaire suite au traitement par siRNA. Nous avons ensuite analysé l'effet de la modulation des niveaux d'Upf1 sur l'ARN du VIH-1 et la traduction des protéines virales en diminuant, surexprimant et récupérant les niveaux intracellulaires d'Upf1 durant l'expression du VIH-1 (clone proviral pNL4.3). Les siRNAs ont été employés pour diminuer le niveau d'Upf1, la surexpression a été réalisée avec un vecteur Flag-Upf1, alors que les niveaux d'Upf1 ont été rétablis en utilisant un vecteur (Flag-Upf1R- Rescue) contenant des mutations silencieuses le rendant insensible au siRNA. Le chapitre 4 présente la discussion et la conclusion de mon projet de maîtrise.

CHAPITRE 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Anticorps

L'anticorps polyclonal reconnaissant les protéines Upf (Upf1, Upf2, Upf3) ont gracieusement été fournis par Jens Lykke-Andersen (University of Colorado). L'anticorps polyclonal anti-p24 (CA) et le monoclonal anti-GAPDH ont été achetés chez Intracell et TechniScience respectivement et ont été utilisés tel que décrit précédemment ⁹⁶. L'anticorps monoclonal anti-FLAG a été acheté chez Sigma-Aldrich.

2.2 ARN interférences

Tous les duplexes siRNA ont été synthétisés par Qiagen-Xeragon. La séquence du duplexe siRNA Upf1 5'AAG ATG CAG TTC CGC TCC ATT 3' est celle décrite par Mendell *et al.*, 2002 ¹⁰⁴. Un siRNA contrôle (siNS) 5' AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT 3' (numéro de catalogue 1022076) provient aussi de Qiagen-Xeragon.

2.3 Culture Cellulaire

Les cellules HeLa ont été utilisées pour toutes les expériences. Les lignées cellulaires HeLa 3C1 (PTC-) et 7C3 (PTC+) ont été gracieusement fournies par Miles Wilkinson (University of Texas) ¹³⁵. Les lignées cellulaires 3C1 et 7C3 expriment le gène TcR- β . Les cellules 3C1 contiennent le gène de type sauvage (CPT-), alors que les cellules 7C3 contiennent un codon prématuré de terminaison (CPT+). Ces cellules ont été cultivées à 37°C dans du medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Gibco Laboratories) contenant 8% de sérum fœtal bovin

(SFB) (Gibco Laboratories) et 1% des antibiotiques pénicilline/streptomycine (Gibco Laboratories) dans un environnement humide contenant 5% de CO₂.

2.4 Clones proviraux

Le clone proviral complet pNL4.3 a été utilisé pour la majorité des expériences. L'expérience de fluorescence d'hybridation *in situ* (FISH) a été réalisée avec les clones proviraux HxBru (vif⁺, vpr⁺, vpu⁻, nef⁻) et HxBru Rev⁻ (vif⁺, vpr⁺, vpu⁻, nef⁻, rev⁻). Le clone proviral HxBru Rev⁻ a été fourni par Dr. Sadaie (NovoMed Pharmaceuticals) ¹³⁶. Éric Cohen (Institut de recherches cliniques de Montréal, Canada) a fourni le clone proviral HxBrupΔ6 qui contient un codon stop après la codon d'initiation de p6 ¹³⁹. Le clone proviral pNL4.3XX a été fourni par Dr. David Ott (NIH/NCI, Frederick, MD) et contient 2 codons stop après les codons d'initiation de la traduction. Il ne produit donc pas de protéines virales ¹³⁷. Les clones proviraux M-tropiques pMAL et pADA ont été fournis par Dr. Anne Gatignol (McGill University).

2.5 Les vecteurs Upf1 et de contrôle

Les vecteurs Upf1R (Rescue), pC1-Flag-Upf1, pC1-Flag (contrôle) et les autres mutants Upf1 (1-1074, Δ20-150 et ΔN40) ont déjà été décrits et ont été gracieusement offerts par Niels Gehring ¹³⁸ (et non publié). Le mutant Upf1 (1-1074) ne possède pas les sites de phosphorylation en C-terminus (régions SQ et SQP). Le mutant Upf1 Δ20-150 n'interagit pas avec la protéine cellulaire Upf2 car il lui manque un doigt de zinc et la région riche en glycine/proline. Dans le mutant Upf1 ΔN40, le présumé site d'interaction avec la protéine SMG-5 a été délété. Enfin, le mutant Upf1 TDN est un mutant transdominant négatif qui contient une mutation dans son domaine hélicase, ce qui inhibe sa fonction dans le mécanisme NMD ¹²¹.

2.6 Transfection

Toutes les transfections ont été réalisées avec Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA) dans du milieu Optimem (sérum réduit – Invitrogen, CA) en suivant les instructions du fabricant. 24h avant les transfections, les cellules HeLa ont été mises en culture dans des plaques NUNC de 6 puits à une confluence de $3.0-3.5 \times 10^5$ cellules par puits. Les transfections des provirus et des siRNAs ont été exécutées comme décrit par Chatel-Chaix *et al.*, 2004⁹⁰. Ensuite, les cellules HeLa ont été transfectées avec siNS et siUpf1, tel que décrit précédemment^{90,96,138}. 24h après, les cellules ont été transfectées de la même façon mais, dépendant de l'expérience et des conditions, ont aussi été transfectées avec les clones proviraux pNL4.3, HxBru ou HxBru Rev- à une concentration de 1 µg, avec 2 µg des vecteurs Upf1 ou avec un vecteur vide par puits. 5h post-transfection, le milieu a été remplacé par du DMEM/SFB en absence d'antibiotique. 30 heures après la seconde transfection, les cellules ont été lavées 3 fois dans du PBS-DEPC et ont ensuite été lysées avec une solution de NP40 1X (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40) ou avec du TRIzol pour l'analyse protéique et d'ARN respectivement.

2.7 Western Blot

La technique de micro-Bradford a été utilisée pour quantifier les extraits protéiques. Entre 20-40 µg de protéines ont été utilisés pour analyse sur gel polyacrylamide de 12%. Les protéines ont été ensuite transférées pour une durée de 2 heures à 4°C et à 250 mA sur une membrane de nitrocellulose (Pall Corporation, NY). Ensuite, du TBST 1X (TBS avec 0.05% Tween 20) contenant 10% de lait a été utilisé pour bloquer la membrane durant 45 minutes. La membrane a été incubée avec l'anticorps primaire durant une heure. Upf1, Upf2, Upf3, p24 (pour pNL4.3 et HxBru) et GAPDH ont été utilisés comme anticorps primaires. Ensuite, la membrane a été lavée 3 fois avec du TBST et incubée 30 minutes avec l'anticorps secondaire

couplé à la peroxydase. Finalement, la membrane a été lavée 4 fois avec TBST et la présence des différents anticorps a été visualisée par ECL ('Enhanced Chemiluminescence') (PerkinElmer, MA).

2.8 Extraction d'ARN

Les cellules HeLa ont été transfectées tel que décrit précédemment. 30 h après la seconde transfection, les cellules ont été lavées 3 fois au PBS-DEPC 1X et l'ARN total a été purifié en utilisant le réactif TRIzol (Invitrogen) selon les conditions suggérées par le manufacturier. Les culots d'ARN ont été resuspendus dans de l'eau sans RNase. L'ARN purifié a été quantifié en lisant sa densité optique à 260 nm.

2.9 Northern Blot

L'ARN extrait des cellules HeLa a été purifié tel que décrit précédemment. Entre 5 et 10 µg d'ARN total ont été utilisés pour l'analyse par Northern Blot. L'ARN a été dénaturé durant 30 minutes à 65°C dans une solution contenant 15% de l'échantillon, 50% de formamide, 20% de formaldéhyde, 5% de bromure d'éthidium et 10% du tampon MOPS 10X [20 mM 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid, 2 mM sodium acetate, 2 mM EDTA]. Ensuite, les échantillons ont été séparés en fonction de leur taille sur un gel dénaturant de 0,8% d'agarose dans du tampon MOPS 1X. Le gel a été transféré durant la nuit par action capillaire sur une membrane de nylon B Biodyne® (Pall Corporation, NY) dans un tampon 20X SSC [3 M NaCl, 300 mM sodium citrate, pH 7.0]. L'ARN a ensuite été fixé sur la membrane avec un rayonnement ultraviolet (Stratalinker, Stratagene).

Les membranes ont été préhybridées pendant 30 minutes à 65°C dans le tampon Church [250 mM sodium phosphate (pH 7.0), 7% SDS, 1 mM EDTA (pH 8.0), 1% bovine serum albumin]. Ensuite, les membranes ont été hybridées durant

12-16 heures à 65°C dans le tampon Church contenant une sonde radioactive marquée au dCTP alpha-³²P. Les séquences d'ARN d'intérêt ont été détectées sur la membrane par hybridation avec des sondes spécifiques radio-marquées. La sonde contre la région TAR a été utilisée pour détecter les ARNs de 9kb, 4kb et 2kb du VIH-1. Cette sonde est un fragment de PCR correspondant à la région 5' qui est commune à tous les ARNm du VIH-1 ¹⁴⁰. La sonde contre l'ARNm du GAPDH a été utilisée comme contrôle ¹⁴⁰. Pour l'expérience où les clones proviraux HxBru et HxBru-Rev- ont été utilisés, la sonde a été la même que celle utilisée pour l'hybridation *in situ*, qui est spécifique pour la région pol de l'ARN génomique du VIH-1 ⁹⁶. Pour l'expérience où les cellules HeLa 3C1 et 7C3 ont été utilisées, l'ARNm du TCR-β a été détecté avec un fragment PCR contre le second exon VDJ en utilisant les oligonucléotides sens 5'ACA CAT GGA GGC TGC AGT CA3' et antisens 5'CGA AAC AGT CAG TCT GGT TC3' et avec le vecteur β-433 minigène, qui ont été gracieusement donnés par Miles Wilkinson (University of Texas).

Après l'hybridation, les membranes ont été lavées deux fois avec 2X SSC-0.1% SDS et 0.1X SSC-0.1% SDS. Les membranes ont ensuite été séchées et exposées à un film durant 24-48h à -80°C dans une cassette avec écran intensificateur.

2.10 Immunoprécipitation

Les cellules HeLa ont été transfectées et les extraits protéiques ont été quantifiés par les méthodes décrites précédemment. Pr55^{Gag} a été immunoprécipitée en utilisant 2 mg de protéines et l'anticorps monoclonal anti-p24 (183 H12-5C) du NIH AIDS Reference and Reagent Program ⁹⁰.

2.11 Fluorescence d'hybridation *in situ* (FISH)

Les cellules HeLa ont été transfectées tel que décrit précédemment, mais à une confluence de 150 000 cellules par puits contenant une lamelle. 30h suivant la seconde transfection, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS-DEPC 1X, fixées dans 4% paraformaldéhyde pour 20 minutes à température de la pièce et lavées avec du PBS-DEPC 1X. Ensuite, les cellules ont été incubées pour 10 minutes à température de la pièce sous légère agitation dans une solution de 0,1 M glycine-PBS-DEPC 1X. Finalement, les cellules ont été perméabilisées dans une solution 0,2% Triton-X-100-PBS-DEPC 1X pour 10 minutes à la température de la pièce (légère agitation). Entre les étapes de fixation et les étapes de perméabilisation, les lamelles ont été doucement lavées avec du PBS-DEPC 1X. Les lamelles fixées ont été gardées à 4°C dans 70% d'éthanol.

Pour l'hybridation *in situ*, les lamelles fixées ont été lavées 2 fois dans du PBS-DEPC 1X pour 30 minutes et ont ensuite été traitées avec de la DNaseI (25U) (Invitrogen) durant 15 minutes à 37°C. Ensuite, chaque lamelle fixée a été hybridée pendant environ 18h à 42°C dans 50µl de tampon d'hybridation [50% formamide, 1 mg/mL de tRNA (Invitrogen), 2X SSPE (300 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄•H₂O, 2 mM EDTA pH 7.4), 5X Denhardt (0.1% Ficoll 400, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% BSA), 5U de RNaseOUT (Invitrogen, Californie), et 25 ng de sonde par lamelle].

La sonde utilisée est antisens contre la région pol de l'ARN de 9kb du VIH-1. Cette sonde, qui est un fragment de 236 nt reconnaîtra seulement l'ARN génomique. La sonde d'ARN marquée à la digoxigenine a été préparée comme décrit précédemment par Bériault *et al.*, (2004) ¹⁴¹ avec le 'DIG RNA Labeling Kit' (Roche Applied Science, Penzberg, Allemagne). Le lendemain, les lamelles ont été lavées dans 50% de formamide pour 15 minutes, 2 fois avec du SSPE 2X pour 15 minutes et 10 minutes dans du PBS-DEPC 1X. Toutes ces étapes ont pris place à 42°C. Ensuite, les lamelles ont été bloquées pour 30 minutes à température de la pièce avec

la solution Roche 1X (Roche Applied Science, Penzberg, Allemagne). Les lamelles ont été lavées avec du PBS-DEPC 1X entre chaque étape. Après les avoir bloquées, les lamelles ont été incubées à 37°C pour 1h avec la première solution d'anticorps contenant l'anticorps monoclonal de souris anti-digoxigénine dans la solution de blocage 1X (Roche Applied Science, Penzberg, Allemagne). Ensuite, elles ont été incubées dans la deuxième solution d'anticorps [anti-DIG de souris contenant un fragment de F(ab')₂ mouton (1:25, Roche Applied Science, Penzberg, Allemagne)]. à 37°C pour 1 h. Par la suite, les lamelles ont été lavées et incubées dans la dernière solution d'anticorps [anti-DIG de mouton conjugué à la fluoresceine (1:25, Roche Applied Science, Penzberg, Allemagne)] à 37°C pour 1 h. Après avoir lavé les lamelles dans du PBS-DEPC 1X, elles ont été incubées avec du DAPI (1:500, 4',6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen, Californie) afin de visualiser le noyau des cellules HeLa. Finalement, les lamelles ont été montées sur lames dans 100 mg/ml de Mowiol (Calbiochem), 25 mg/ml de DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, Sigma), 25% glycérol et 100 mM Tris-HCl pH 8.5. Les cellules ont été analysées en utilisant un microscope à fluorescence Olympus BX-51.

2.12 Analyse du cycle cellulaire

Les cellules HeLa ont été transfectées tel que décrit précédemment. Leur contenu en ADN a ensuite été analysé par cytométrie en flux (FACS). 30h après la seconde transfection, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS-DEPC 1X et ensuite trypsinisées. Après deux lavages avec du PBS-DEPC 1X, les cellules ont été resuspendues dans 80% d'éthanol à 4°C jusqu'au lendemain. Les cellules ont alors été lavées deux fois dans du PBS-DEPC 1X et ensuite traitées avec 180 U/ml de RNase A et 30 µg/ml d'iodure de propidium pour 30 minutes à 37°C. Ensuite, le FACS a été utilisé pour l'analyse d'ADN.

CHAPITRE 3: RÉSULTATS

3.1 Diminution de l'expression intracellulaire d'Upf1 par la technique d'interférence à l'ARN.

Pour étudier le rôle d'Upf1 durant la réplication du VIH-1, nous avons premièrement déterminé l'efficacité de la technique d'interférence à l'ARN (siRNA) dans les cellules HeLa. En transfectant les cellules avec un siRNA contre Upf1 et un siRNA contrôle (siNS), nous avons obtenu une baisse significative du niveau d'expression d'Upf1 d'environ 95%, comme le montre la figure 3.1. L'expression d'Upf1 a été analysée par Western Blot. Le Western Blot contre GAPDH sert de contrôle quantitatif.

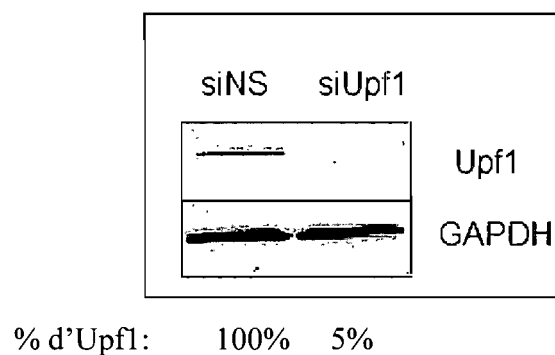


FIGURE 3.1: Diminution du niveau intracellulaire d'Upf1 par la technique d'interférence à l'ARN (siRNA). Western Blot montrant la diminution du niveau endogène d'Upf1 trente heures après transfection du siRNA Upf1 dans les cellules HeLa.

3.2 La diminution d'Upf1 par siRNA n'induit pas une accumulation des cellules en phase S.

Récemment, il a été démontré que la diminution du niveau intracellulaire d'Upf1 mène à une accumulation des cellules en phase S^{111,112}. Nous avons voulu vérifier si la diminution d'Upf1 engendrait un tel arrêt dans la phase S du cycle cellulaire 30h suivant la transfection des cellules HeLa avec le siRNA contre Upf1 (siUpf1). La Figure 3.2A montre l'efficacité du siRNA. Les résultats de l'analyse montrent que les cellules traitées avec le siRNA dirigé contre Upf1 et le siRNA contrôle, en absence ou en présence du VIH-1, présentent une distribution cellulaire semblable 30 heures après la transfection (Figure 3.2BC). Cependant, lorsque les cellules sont récoltées quatre jours après la transfection, nous observons une accumulation marquée des cellules en phase S, mais uniquement lorsque le siUpf1 est utilisé (Figure 3.2C).

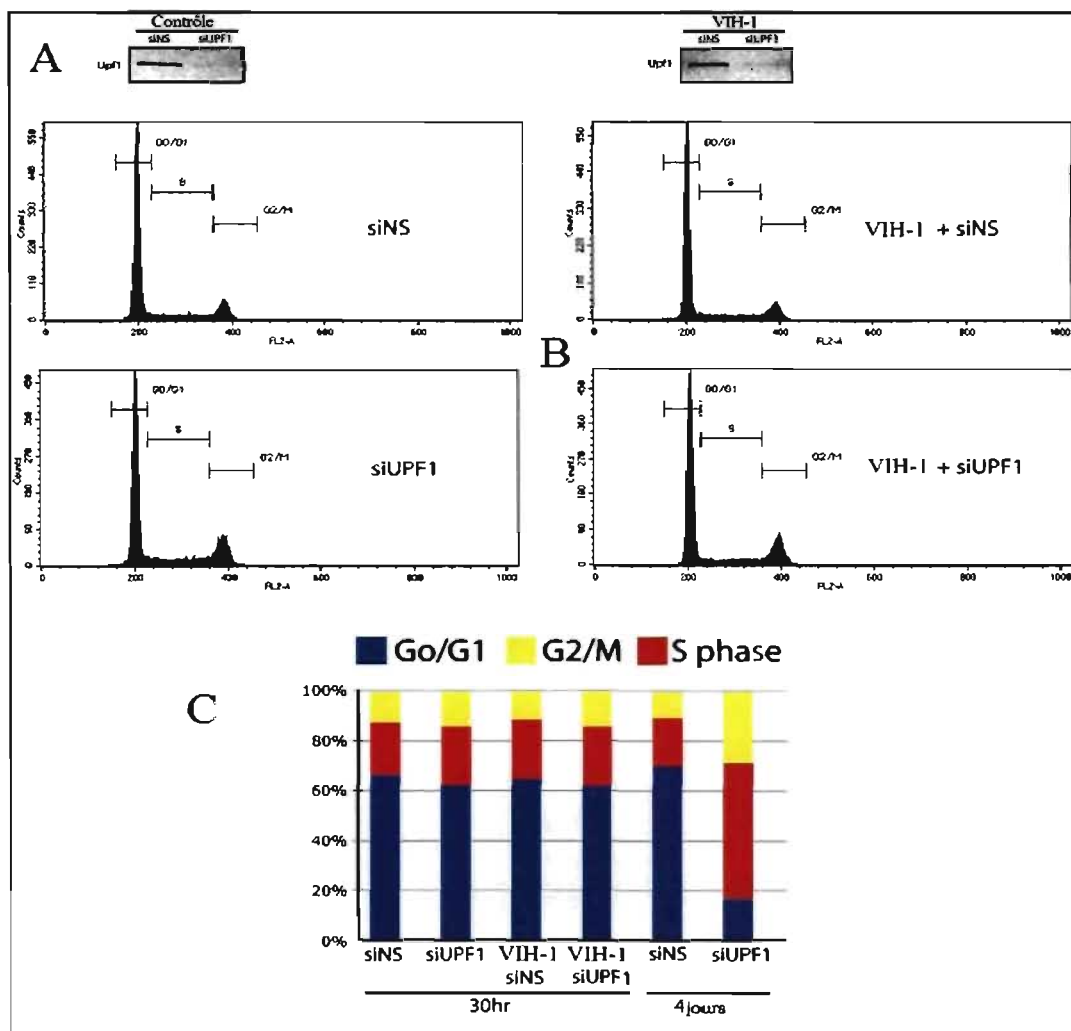


FIGURE 3.2: Analyse du cycle cellulaire, trente heures et quatre jours après traitement des cellules avec siUpf1. Les cellules HeLa transfectées avec le siNS et le siUpf1 en présence ou en absence du clone proviral pNL4.3 ont été récoltées 30h et 4 jours après la transfection. Avant la collecte, les cellules ont été traitées avec de l'iodure de propidium pour être ensuite analysées par FACS. La figure 3.2A montre les niveaux d'expression d'Upf1 trente heures après traitement avec siRNA NS et Upf1, en absence ou en présence de pNL 4.3. La figure 3.2B montre la distribution du cycle cellulaire dans les mêmes conditions mentionnées plus haut. Les histogrammes inférieurs (figure 3.2C) représentent les résultats de l'analyse du cycle cellulaire. Les phases Go/G1, S et G2/M sont distinguées par différentes couleurs.

3.3 L'immunoprécipitation de pr55^{Gag} montre la présence d'Upf1 dans le complexe avec pr55^{Gag}.

Pr55^{Gag} a été immunoprécipitée dans les cellules nontransfectées (Mock) ou transfectées avec le clone proviral complet pNL4.3. Deux mg d'extraits protéiques ont été utilisés pour l'immunoprécipitation avec l'anticorps monoclonal anti-p24, tel que décrit dans la section matériels et méthodes. Upf1 et pr55^{Gag} ont été immunoprécipitées avec l'anticorps anti-p24, comme le démontrent le Western Blot. On peut clairement voir la présence d'Upf1 dans le complexe RNP de pr55^{Gag} (Figure 3.3). GAPDH a été utilisée comme contrôle pour la quantité de protéines et pour confirmer la spécificité de l'anticorps utilisé durant l'immunoprécipitation.

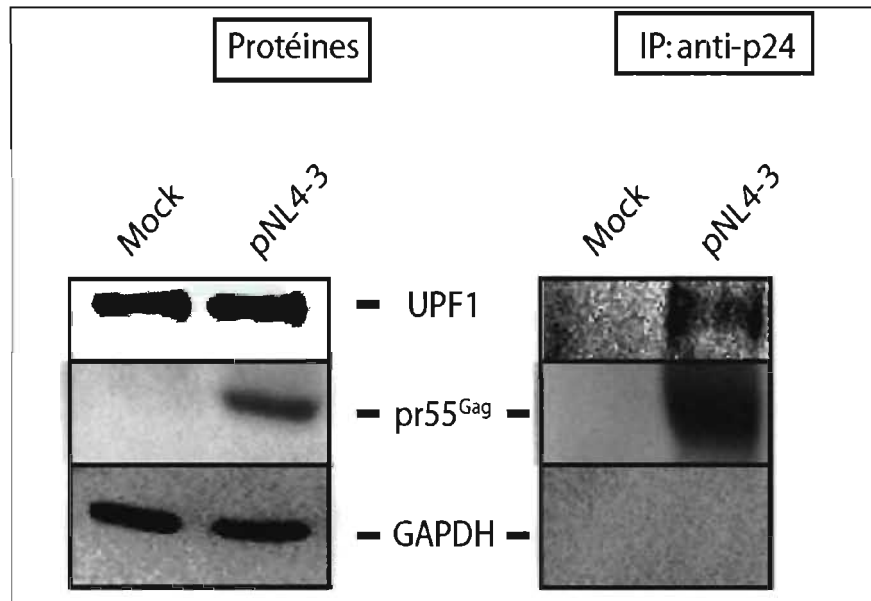


FIGURE 3.3: Upf1 forme un complexe protéique avec pr55^{Gag}. La protéine structurale pr55^{Gag} a été immunoprécipitée dans les cellules HeLa en présence et en absence de pNL4.3 avec l'anticorps monoclonal anti-p24. Trente µg et 2 mg d'extraits protéiques ont été respectivement utilisés pour confirmer l'expression des protéines et pour l'immunoprécipitation. Les niveaux intracellulaires d'Upf1, pr55^{Gag} et GAPDH ont été estimés par Western Blot. GAPDH a été utilisée comme contrôle quantitatif.

3.4 Effets de la modulation des niveaux intracellulaires d'Upf1 sur la synthèse de pr55^{Gag} et de l'ARN génomique du VIH-1.

Nous avons diminué, surexprimé et rétabli les niveaux d'Upf1 durant l'expression du VIH-1 (Mock: ne contient pas le vecteur pNL4.3, mais seulement pCI-Flag). Le niveau d'Upf1 a été rétabli en utilisant le vecteur Flag-Upf1R (Rescue), qui contient des mutations silencieuses qui le rendent insensible au siRNA. Dans les cas où Upf1 n'est pas surexprimée, un vecteur vide de contrôle (pCI-Flag) a été transfecté pour maintenir les mêmes conditions. Nous avons ensuite analysé les niveaux protéiques d'Upf1, de pr55^{Gag} et de GAPDH par Western Blot. Les niveaux d'ARN génomique et l'ARNm de *gaphd* (contrôle de la quantité d'ARN) ont aussi été analysés par Northern Blot.

3.4.1 Niveaux de pr55^{Gag} suite à la modulation des niveaux d'Upf1.

La diminution du niveau intracellulaire d'Upf1 a engendré une réduction dramatique de la synthèse de pr55^{Gag} (figure 3.4, rangées 4 et 6), alors que la surexpression d'Upf1 avec le vecteur Flag-Upf1 ou Rescue (Flag-Upf1R) a mené à son augmentation significative (figure 3.4, rangées 5 et 7). En utilisant le vecteur Rescue (Flag-Upf1R) pour récupérer les niveaux d'Upf1 dans les conditions siUpf1, la synthèse de pr55^{Gag} a été rétablie dans les cellules (figure 3.4, rangée 8). De plus, la diminution du niveau intracellulaire d'Upf1 a résulté en une diminution de la synthèse de pr55^{Gag} par les souches T (cellules T-lymphocytes) (figure 3.4, rangées 4 et 6) et M (Macrophages) (figure 3.5, rangées 4 et 6) tropiques du VIH-1. pNL4.3 est T-tropique, alors que pMAL et pADA sont M-tropiques. Ces résultats suggèrent qu'Upf1 peut influencer l'efficacité de la traduction de l'ARN génomique durant la synthèse de pr55^{Gag}.

3.4.2 Niveaux d'ARN génomique après la modulation des niveaux d'Upfl.

La diminution d'Upfl par la technique de siRNA a résulté en une chute dramatique de l'ARN génomique (figure 3.4, rangées 4 et 6), alors que les niveaux d'ARN génomique ont augmenté significativement dans les conditions de surexpression d'Upfl (figure 3.4, rangées 5 et 7). La réduction de l'ARN génomique a été observée dans les souches T- (figure 3.4, rangées 4 et 6) et M-tropiques (figure 3.5, rangées 4 et 6) du VIH-1. Cependant, les niveaux d'ARN génomique n'ont pas été rétablis (figure 3.4, rangée 8), ce qui suggère qu'Upfl pourrait jouer un rôle dans la stabilité de l'ARN génomique.

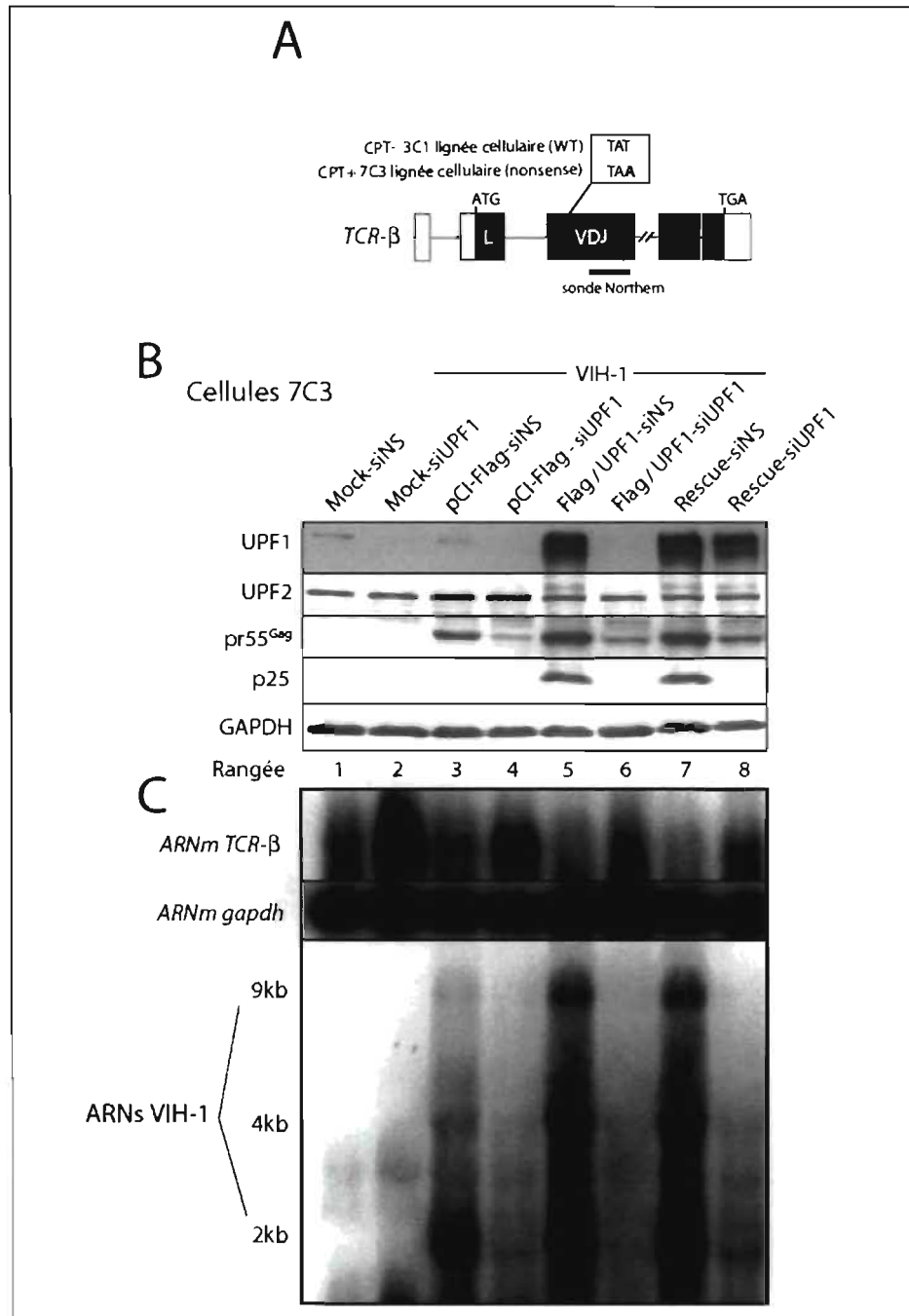


FIGURE 3.4: L'expression d'Upf1 est essentielle pour le mécanisme NMD et pour la stabilité de l'ARN du VIH-1. Les lignées cellulaires 3C1 et 7C3 expriment le gène TcR-β. Les cellules 3C1 contiennent le gène de type sauvage (CPT-), alors que les cellules 7C3 contiennent un codon de terminaison prématurée (CPT+) (figure 3.4A) ¹⁴². Ces cellules ont été transfectées en absence de pNL4.3 (Mock), ou avec le

clone proviral complet pNL4.3, en présence des vecteurs codant pour Upf1 [(Flag-Upf1 ou Flag-Upf1R (Rescue)], ou avec pCI-Flag (vecteur vide), ainsi qu'en présence de siNS ou de siUpf1. L'expression de Upf1, Upf2, GAPDH et pr55^{Gag} a été analysée par Western blot (figure 3.4B), alors que l'ARNm du TcR- β , de *gapdh* et des ARNs viraux (figure 3.4C) ont été examinés 30h suivant la transfection par Northern Blot. Chacune des trois espèces d'ARN du VIH-1 (9, 4, et 2kb) est révélée. De plus, des résultats identiques ont été observés dans la lignée cellulaire 3C1 (résultats non montrés). Par contre, l'expression de TcR- β est restée constante dans cette lignée.

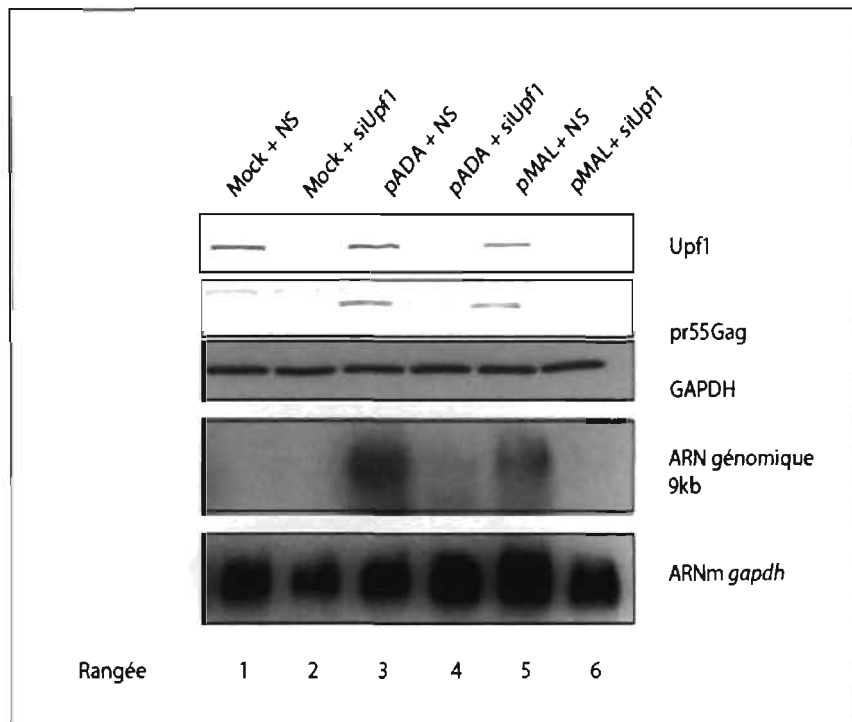


FIGURE 3.5: La diminution du taux intracellulaire d’Upf1 réduit la synthèse de pr55^{Gag} et de l’ARN génomique dans les souches M (macrophage)-tropiques. Les cellules HeLa ont été transfectées avec les clones proviraux M-tropiques pADA et pMAL en la présence de siNS ou de siUpf1. Les niveaux d’Upf1, pr55^{Gag} et GAPDH ont été analysés par Western Blot, alors que l’ARNm *gapdh* et l’ARN génomique ont été visualisés par Northern Blot.

3.5 Le rôle d'Upf1 pendant la réplication du VIH-1 diffère de son rôle dans le mécanisme NMD.

Le rôle d'Upf1 est très bien caractérisé dans le mécanisme de dégradation des ARNm aberrants dénommé NMD. En bref, c'est le recrutement d'Upf1 dans le complexe NMD qui déclenche la dégradation des ARNm. En présence d'Upf1, les ARNm qui contiennent un CPT sont dégradés, tandis qu'en son absence, les ARNm sont stabilisés et, subséquemment, leur niveau augmente.

3.5.1 Les niveaux de l'ARNm TcR- β

Un bon moyen pour étudier le mécanisme NMD est d'utiliser les lignées cellulaires HeLa 3C1 et 7C3. Ces deux lignées cellulaires contiennent le gène TcR- β . Les cellules 3C1 possèdent le gène de type sauvage, alors que les cellules 7C3 renferment un codon de terminaison prématurée (CPT) (Figure 3.4A). L'ARNm de TcR- β est constant dans les cellules 3C1, tandis qu'il varie en fonction de la quantité d'Upf1 dans les cellules 7C3 ¹⁴².

Lorsque la quantité intracellulaire d'Upf1 est faible, il y a stabilisation de l'ARNm de TcR- β (figure 3.4C, rangées 2, 4 et 6), puisque le mécanisme NMD ne peut être déclenché. Par contre, la surexpression d'Upf1 amène une dégradation de l'ARNm du TcR- β , en raison de l'activation du mécanisme NMD (figure 3.4C, rangées 5 et 7).

3.5.2 La surexpression d'une forme transdominante négative (TDN) d'Upf1 augmente les niveaux d'ARN génomique.

Le mutant TDN R844C est un transdominant négatif d'Upf1 qui n'exerce pas une fonction NMD. Ainsi, sa surexpression n'engendre pas la dégradation des

ARNm aberrants puisque le mécanisme NMD ne peut être déclenché. Nous avons comparé l'effet de la surexpression de ce mutant avec celle du type sauvage sur l'ARN génomique du VIH-1 (figure 3.6, rangées 3 et 4). On peut voir que les deux protéines amènent une augmentation semblable et significative de l'ARN génomique du VIH-1 (figure 3.6, rangées 3 et 4). De plus, on peut aussi voir que la surexpression du TDN augmente le niveau d'ARN génomique (Figure 3.6, rangées 2 et 4). Ces résultats montrent qu'Upfl augmente l'expression de l'ARN génomique du VIH-1 indépendamment de sa fonction dans le mécanisme NMD.

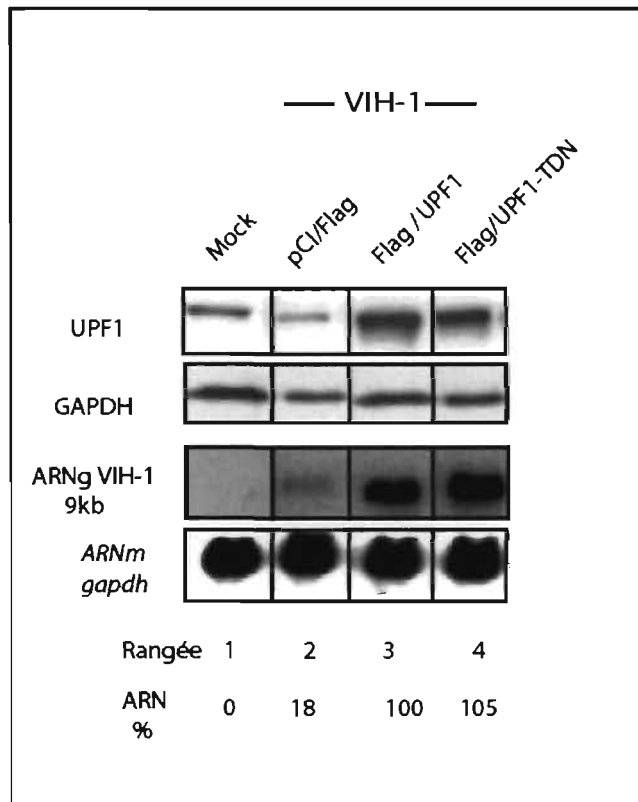


FIGURE 3.6: Augmentation de l'ARN génomique avec un mutant transdominant négatif d'Upf1. Les cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur vide pCI-Flag (Mock) ou avec le clone proviral pNL4.3 en présence de pCI-Flag, de Flag-Upf1, ou de Flag-Upf1 TDN. Les niveaux d'Upf1 et de GAPDH ont été examinés par Western Blot, et les niveaux de l'ARNm *gapdh* et de l'ARN génomique du VIH-1 ont été analysés par Northern Blot.

3.5.3 L'ARN génomique contenant un CPT n'est pas un substrat pour le mécanisme NMD.

La présence d'un CPT au sein d'ARNm déclenche sa dégradation *via* le mécanisme NMD. Nous avons exprimé des mutants proviraux contenant des CPTs (pNL4.3XX et HxBruΔp6). Le mutant pNL4.3XX contient deux CPTs dans le cadre de lecture du gène *gag*. Le premier codon empêche le déclenchement de l'initiation de la traduction de l'ARN au codon initial AUG, alors que le second termine prématurément la traduction en amont du codon AUG du gène de la capsid. Le mutant HxBruΔp6 contient un CPT dans la région C-terminale de la région p6, situé après le changement de cadre de lecture (Figure 3.7A). En diminuant le niveau intracellulaire d'Upf1 (siRNA), nous avons voulu savoir si l'ARN génomique du VIH-1 était un substrat pour le mécanisme NMD, ce qui induirait sa dégradation. Nous avons aussi voulu savoir si Upf1 pouvait influencer les niveaux de pr55^{Gag}. Les cellules HeLa déplétées d'Upf1 par siRNA ont ensuite été transfectées avec pNL4.3 (WT), pNL4.3XX et HxBruΔp6 (figure 3.7B). Nous pouvons observer que la diminution d'Upf1 n'a pas résulté en une chute des niveaux des ARNs génomiques des deux mutants, ou du pr55^{Gag} de HxBruΔp6. La figure 3.7B montre que la déplétion d'Upf1 n'influence pas les niveaux d'ARN génomique ou de pr55^{Gag}. Ainsi, la présence des CPTs dans le cadre de lecture de *gag* n'est pas reconnue par le mécanisme NMD. Un autre mécanisme doit donc être en jeu.

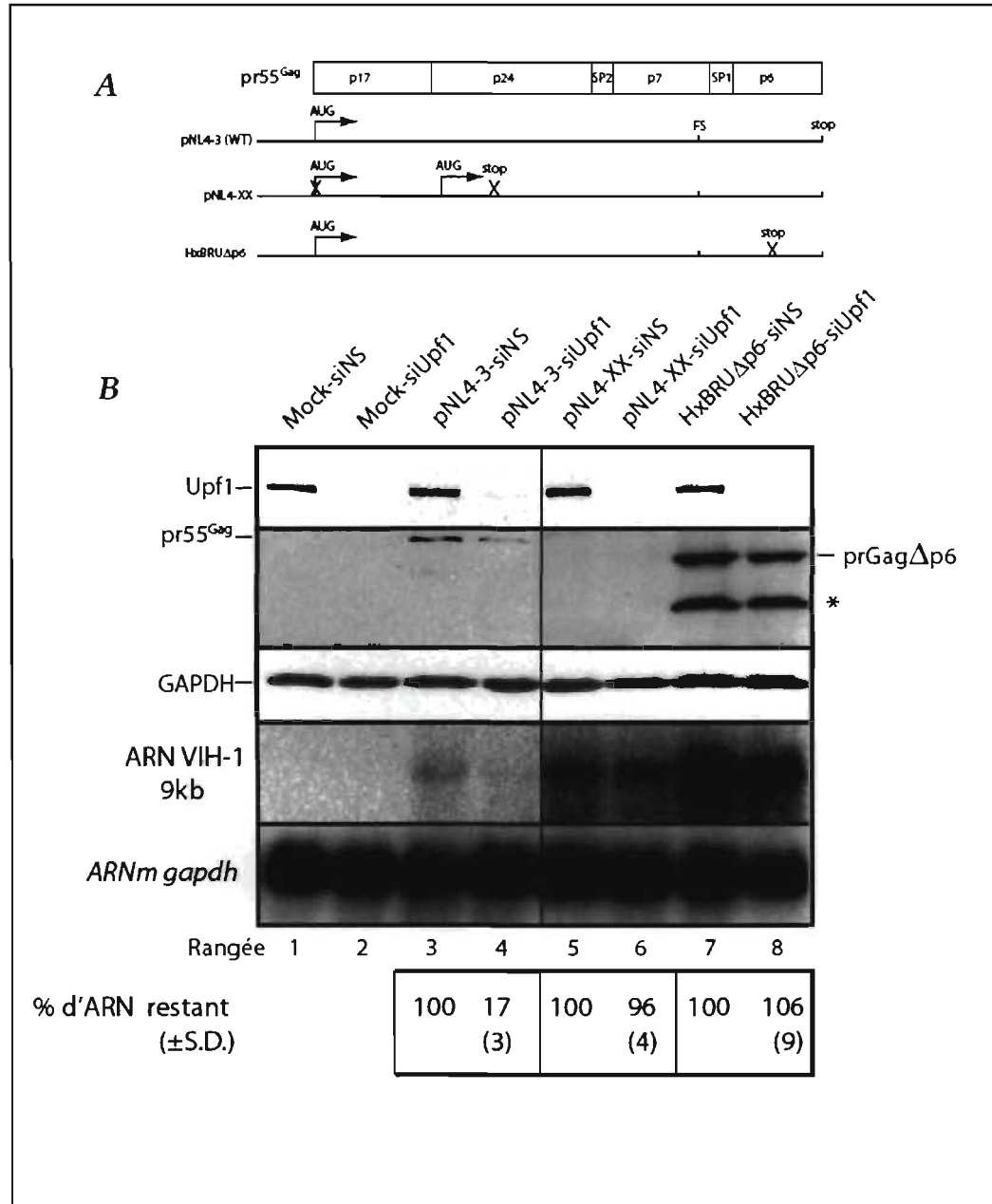


FIGURE 3.7: Le mécanisme NMD ne reconnaît pas l'ARN génomique contenant un CPT. Les cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur vide (mock), avec pNL4.3 ou avec les mutants pNL4.3XX ou HxBruΔp6 en présence des

siRNA siNS ou siUpfl. La figure A montre un schéma des trois clones viraux utilisés. pNL4.3 code pour le provirus de type sauvage. Le mutant pNL4.3XX contient deux codons stop qui empêchent la synthèse de pr55^{Gag}. Le mutant HxBruΔp6, quant à lui, contient un CPT juste avant la région p6, ce qui résulte en une protéine pr55^{Gag} tronquée¹³⁷. Les cellules ont été collectées 30h suivant la transfection. Les niveaux protéiques d'Upfl, pr55^{Gag} et GAPDH ont été visualisés par Western blot, alors que les niveaux d'ARNm *gapdh* et génomique ont été analysés par Northern Blot. Les pourcentages calculés sont normalisés à la quantité d'ARNm *gapdh*. L'astérisque (*) démontre la protéine pr55^{Gag} tronquée en raison de l'absence de la protéine p6.

3.6 L'expression d'Upf1 peut restaurer la synthèse de pr55^{Gag}, mais pas les niveaux d'ARN génomique.

Notre incapacité à récupérer les niveaux d'ARN génomique du VIH-1 (section 3.4.2) en utilisant le vecteur Flag-Upf1R (Rescue) résistant au siRNA nous a poussé à étudier cela plus profondément. Une expérience a été conçue afin d'évaluer dans quelle mesure nous pourrions restaurer les niveaux d'expression de pr55^{Gag} et de l'ARN génomique en utilisant le vecteur Flag-Upf1R (Rescue). Les cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur vide pCI-flag (mock), le clone proviral pNL4.3, les siRNA siNS et siUpf1, en présence des doses croissantes du vecteur Flag-Upf1R (Rescue). En augmentant la concentration du vecteur Upf1R, nous avons pu rétablir les niveaux de pr55^{Gag} (figure 3.8A), mais les niveaux d'ARN génomique sont restés constants (Figure 3.8B).

Une analyse plus détaillée a alors été exécutée pour évaluer l'importance de l'expression d'Upf1 à différents temps après la transfection (Figure 3.9). Les cellules ont été traitées avec le vecteur vide pCI-flag ou flag-Upf1R en présence du siRNA siNS ou siUpf1. Le niveau d'expression des protéines (pr55^{Gag}, Upf1, GAPDH) et d'ARN (génomique et *gapdh*) ont été analysés 6, 12, 24 et 30 heures après la transfection. La figure 3.9A montre que l'expression d'Upf1 est restée stable, alors que les niveaux de pr55^{Gag} et de l'ARN génomique ont augmenté avec le temps dans les conditions siNS/pCI-flag/pNL4.3. La diminution du taux d'Upf1 a occasionné la réduction des niveaux de pr55^{Gag} et de l'ARN génomique aux quatre temps analysés, alors que la surexpression d'Upf1 a eu l'effet contraire. Par contre, même si les niveaux d'Upf1 ont été récupérés avec l'utilisation du vecteur Flag-Upf1R (Rescue) en condition siUpf1, ce qui a mené à l'augmentation de la synthèse de pr55^{Gag}, il n'y a eu aucun changement des niveaux de l'ARN génomique (figure 3.9A). La figure 3.9B représente les changements relatifs du niveau de l'ARN génomique comparé à l'ARNm de *gapdh* aux points étudiés. La figure 3.9C représente les ratios récupérés de pr55^{Gag} et d'ARN génomique. Nous pouvons voir que même si les niveaux de pr55^{Gag} ont été rétablis à 80% (comparé à la surexpression d'Upf1 à tous les points),

les niveaux d'ARN génomique ont seulement atteint 10-20% au dernier point étudié. Ces résultats démontrent que l'expression d'Upfl est suffisante pour presque totalement récupérer les niveaux de synthèse de pr55^{Gag}, mais n'est pas suffisante pour rétablir le niveau d'ARN génomique. Le fait que les niveaux de pr55^{Gag} peuvent être récupérés semble être dû à l'efficacité de traduction de l'ARN résiduel dans le cytoplasme.

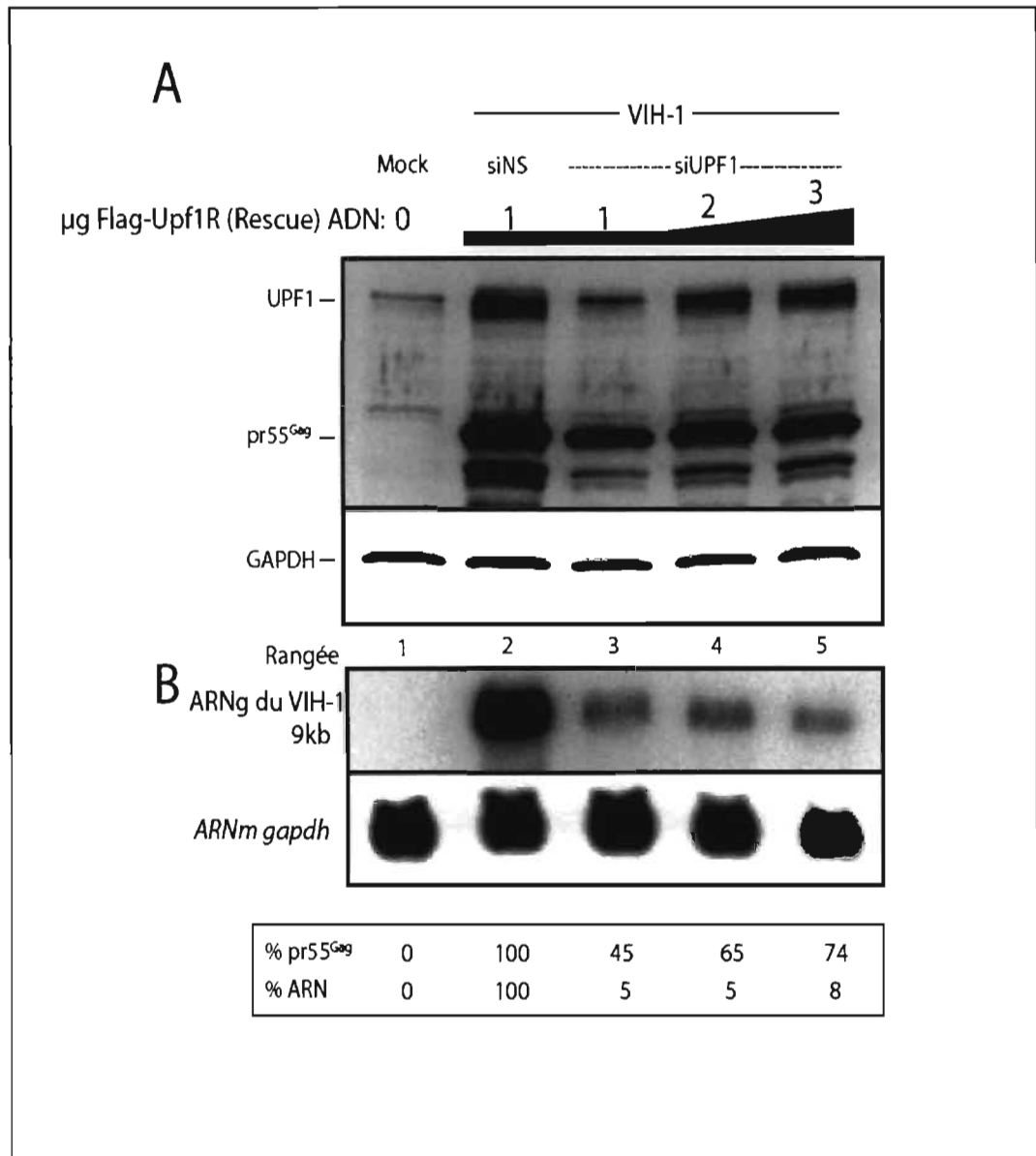


FIGURE 3.8: L'expression de Flag-Upf1R (rescue) rétablit la synthèse de pr55^{Gag}, mais pas les niveaux d'ARN génomique. Les cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur vide pCI-Flag (Mock), avec pNL4.3 + siNS, ou avec pNL4.3 + siUpf1 en présence d'une concentration croissante du vecteur Flag-Upf1R

(Rescue). Les niveaux protéiques d'Upf1, pr55^{Gag} et GAPDH ont été visualisés par Western Blot et les niveaux de l'ARN génomique et de l'ARNm de *gapdh* par Northern Blot. Les pourcentages calculés ont été normalisés aux niveaux de GAPDH et d'ARNm *gapdh*.

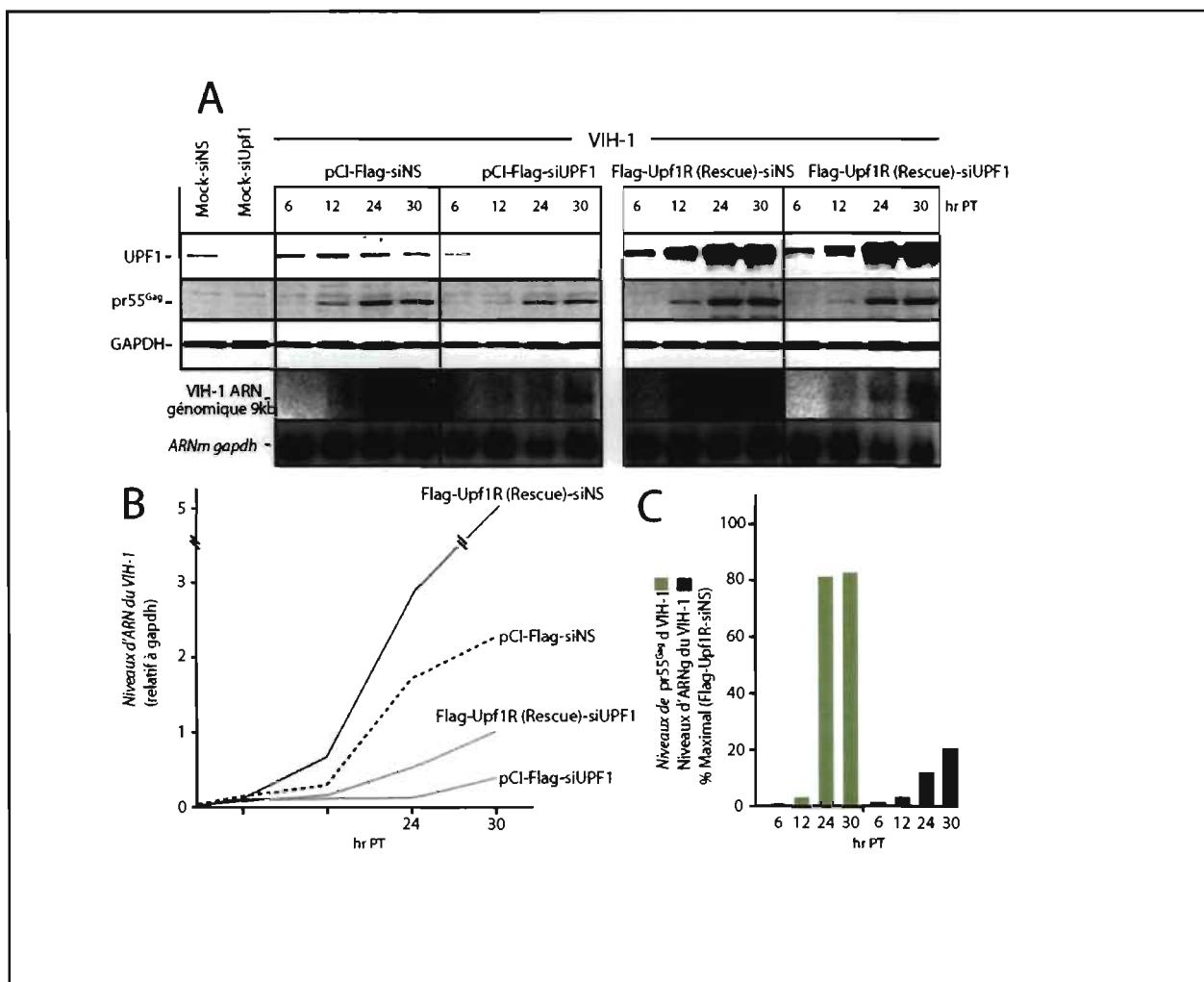


FIGURE 3.9: L'importance de l'expression d'Upf1 à différents temps sur les niveaux de pr55^{Gag} et d'ARN du VIH-1. Les cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur vide pCI-flag ou avec Flag-Upf1R (rescue) en présence de pNL4.3, avec les siRNA siNS ou siUpf1. Elles ont été récoltées 6, 12, 24 et 30 heures après transfection. Les niveaux protéiques d'Upf1, pr55^{Gag} et de GAPDH ont été analysés par Western blot, tandis que les niveaux d'ARNm *gapdh* et génomique du VIH-1 ont été analysés par Northern Blot (figure 3.9A). La figure 3.9B montre la quantification des niveaux de l'ARN génomique dans les quatre conditions et à chacun des différents temps, relatifs à l'ARNm *gapdh*. La figure 3.9C indique les niveaux de pr55^{Gag} (barres vertes) et de l'ARN génomique (barres noires) calculés par le ratio :

la récupération de leurs niveaux versus leurs niveaux durant les conditions de surexpression d'Upfl.

3.7 Les effets d'Upf1 ne sont pas limités au compartiment cytoplasmique.

En raison des effets dramatiques de la déplétion d'Upf1 sur l'ARN génomique du VIH-1, nous avons voulu explorer le compartiment cellulaire dans lequel ces effets sont exercés. Nous avons pris avantage du compartimentage à prédominance nucléaire de l'ARN génomique en l'absence de Rev. Les cellules ont été transfectées avec le vecteur vide pCI-flag, avec le clone proviral HxBru ou pcMRev(-) dans des conditions siNS et siUpf1. Ensuite, le niveau de pr55^{Gag} a été quantifié par Western blot (figure 3.10A), alors que le niveau d'ARN génomique a été analysé par Northern Blot (figure 3.10B) et par FISH (figure 3.10C). Tel que démontré précédemment, la diminution du niveau d'Upf1 par la technique siRNA a mené à une diminution des niveaux de pr55^{Gag} (figure 3.10A). Dans le cas de pcMRev(-), étant donné que l'ARN génomique n'est pas transporté du noyau au cytoplasme, il n'y a pas de synthèse de pr55^{Gag} (figure 3.10A).

L'analyse des niveaux d'ARN génomique par Northern blot en utilisant une sonde spécifique pour la région *pol* a indiqué que même pendant l'expression de pcMRev(-), les niveaux d'ARN génomique ont diminué significativement en raison de la déplétion d'Upf1 le siRNA (figure 3.10B). Nous constatons aussi que l'ARN multi épissé de 2kb, visualisé avec la sonde contre la région TAR, n'est pas affecté par la diminution du taux intracellulaire d'Upf1.

Afin de s'assurer que l'ARN génomique est confiné au noyau durant ces expériences, la technique de FISH a été utilisée pour examiner la distribution de l'ARN génomique dans les cellules. En utilisant la sonde spécifique à la région *pol*, nous pouvons voir que l'ARN génomique est confiné au noyau. De plus, en présence et en absence de Rev, la diminution d'Upf1 a résulté en une perte drastique des niveaux d'ARN génomique (figure 3.10C). Ceci pourrait indiquer qu'Upf1 est importante pour la stabilité de l'ARN génomique du VIH-1 suite à la transcription du génome viral.

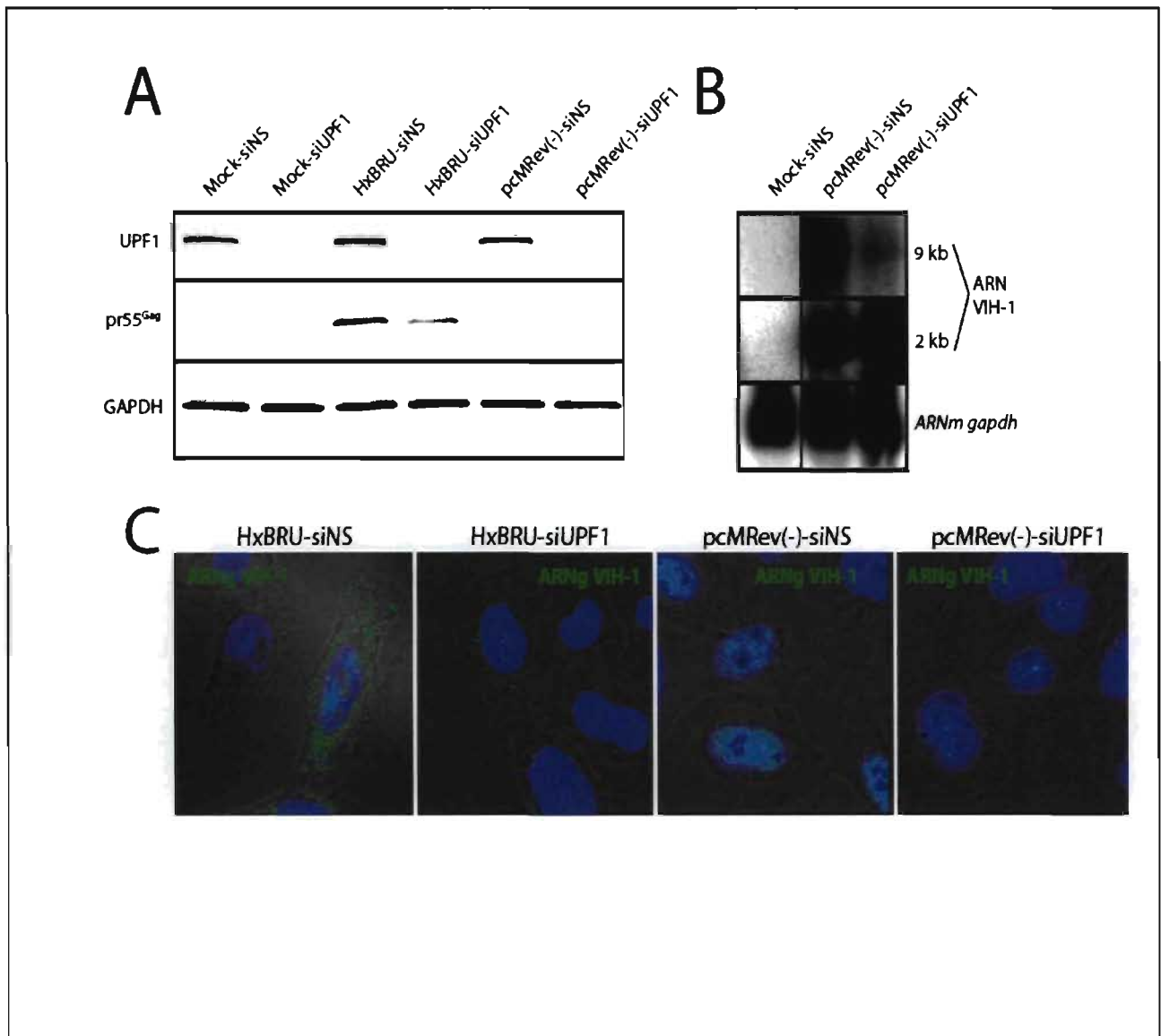


FIGURE 3.10: Effet de la diminution du taux intracellulaire d'Upf1 sur l'ARN génomique du VIH-1 dans différents compartiments cellulaires. Les cellules HeLa ont été transfectées avec siNS ou siUpf1 en présence du vecteur vide (mock), du clone HxBru (Rev+) et pcMRev(-). Les cellules ont été récoltées 30h après la transfection. Les niveaux d'Upf1, pr55^{Gag} et GAPDH ont été analysés par Western blot (figure A). Les niveaux d'ARN 9kb et 2kb et l'ARNm *gapdh* ont été analysés par Northern Blot (figure B). L'analyse par FISH (figure C) a été utilisée pour

vérifier le confinement de l'ARN génomique dans le noyau dans la condition Rev-. L'ARN génomique est révélé par la couleur verte, alors que le noyau est coloré en bleu. Les images fusionnées comprennent aussi le contraste de la phase.

3.8 Le rôle d'Upf1 est spécifique dans la régulation de l'ARN du VIH-1.

Pour établir d'une autre façon la spécificité d'Upf1, nous avons surexprimé Upf1 et Upf3b, une des autres protéines cellulaires impliquées dans le mécanisme NMD (figure 3.11). Nous avons ensuite analysé les niveaux protéiques de Upf1, Upf3b et GAPDH par Western Blot, ainsi que le niveau de l'ARN génomique et de l'ARNm de *gapdh* par Northern Blot. La protéine et l'ARNm de *gapdh* ont été utilisés comme contrôle. Tel que démontré précédemment, la surexpression d'Upf1 mène à une augmentation significative des niveaux de l'ARN génomique du VIH-1 (figure 3.11, rangées 2 et 3), tandis que la surexpression d'Upf3b n'a eu aucun effet, démontrant la spécificité d'Upf1 au sein du VIH-1 (figure 3.11, rangées 2 et 4).

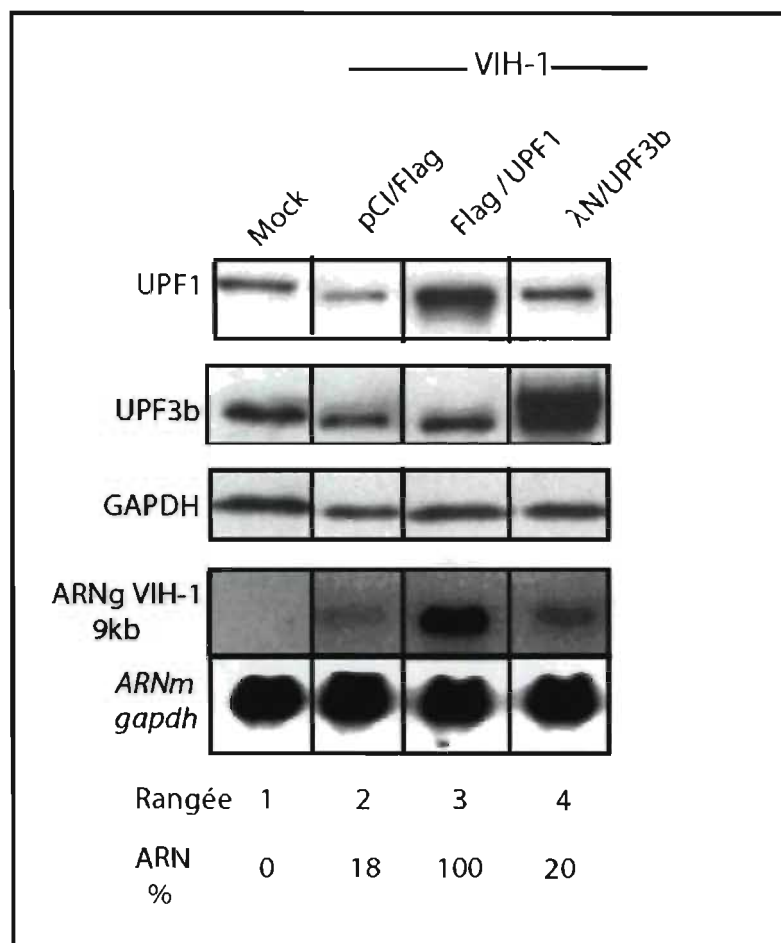


FIGURE 3.11: Spécificité d'Upf1 sur la stabilité de l'ARN génomique. Les cellules ont été transfectées avec le vecteur vide (mock). Les cellules ont été transfectées avec pNL4.3, avec pCI-Flag, Flag-Upf1 ou λN-Upf3b. Les niveaux d'Upf1, Upf3b et GAPDH ont été analysés par Western Blot, et les niveaux de l'ARN génomique et de l'ARNm *gapdh* ont été analysés par Northern Blot. Les pourcentages calculés sont normalisés aux niveaux de l'ARNm de *gapdh*.

3.9 L'importance de certaines régions d'Upf1.

Nous avons entamé des études afin de définir les régions d'Upf1 responsables de la stimulation de l'expression de l'ARN génomique du VIH-1. Nous avons surexprimé des mutants tronqués en N- et en C- terminal, et nous avons comparés leurs effets sur l'augmentation des niveaux de l'ARN génomique du VIH-1 avec celui du type sauvage d'Upf1 (figure 3.12). Aucun des mutants examinés n'a eu un effet stimulateur semblable à celui du type sauvage, ce qui suggère une importance de ces régions sur la stabilité de l'ARN génomique du VIH-1 (Figure 3.12, rangées 2 à 6).

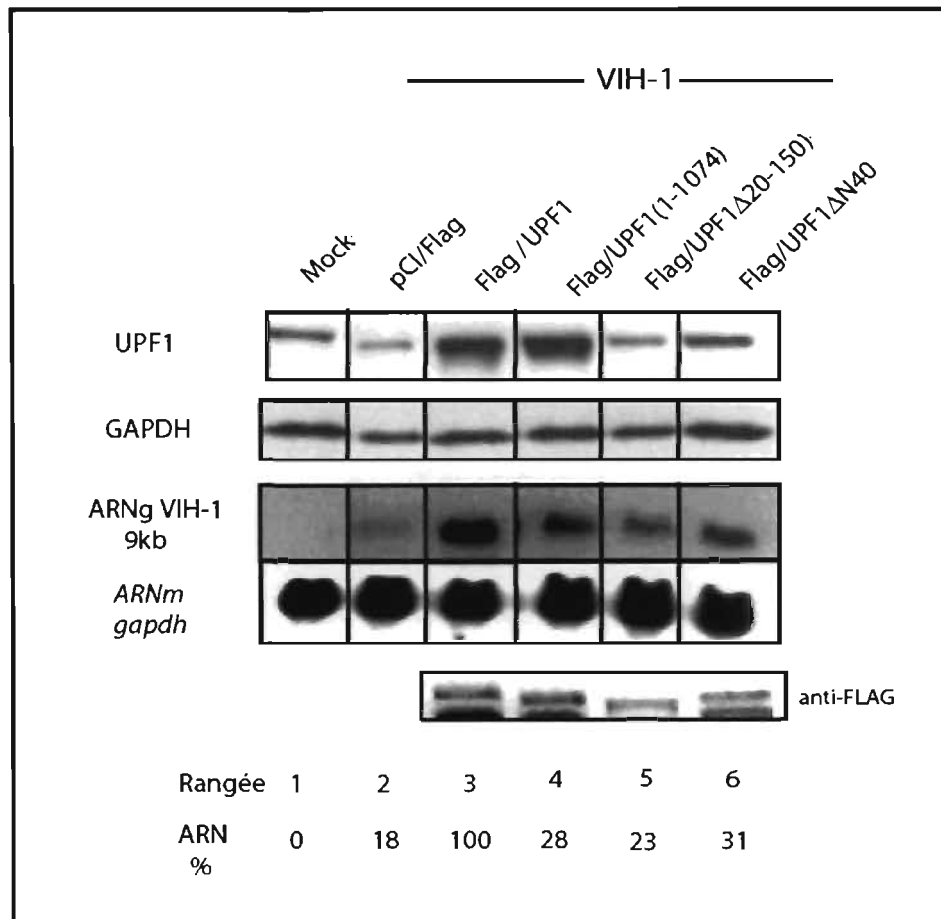


FIGURE 3.12: La surexpression de certains mutants d’Upf1 ne stabilise pas l’ARN génomique autant que le type sauvage. Les cellules ont été transfectées avec le vecteur vide (mock), avec pNL4.3, et avec pCI-Flag, Flag-Upf1 ou les mutants 1-1074, Δ20-150 et ΔN40. Les niveaux d’Upf1 et GAPDH ont été analysés par Western Blot, et les niveaux de l’ARN génomique et de l’ARNm *gapdh* ont été analysés par Northern Blot. L’anticorps monoclonal anti-FLAG a été utilisé puisque l’anticorps anti-Upf1 ne reconnaît pas ces mutants. Les pourcentages calculés sont relatifs à celui de l’ARNm de *gapdh*.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Importance d'Upfl dans la régulation de l'ARN du VIH-1

Nous avons vérifié l'efficacité de la technique de siRNA contre Upfl (Figure 3.1). Nous avons obtenu une diminution de l'expression d'Upfl d'approximativement 85-98% dépendant des expériences. Nous avons ensuite déterminé que la diminution du niveau intracellulaire d'Upfl n'a pas provoqué d'arrêt dans le cycle cellulaire 30 heures après la transfection, le temps où les cellules ont été récoltées pour être analysées (figure 3.2).

Des études de notre équipe ont identifié Upfl dans le complexe RNP du VIH-1 (Ajamian L., *et al.*, manuscrit en préparation). Ces résultats ont été validés suite à l'identification d'Upfl dans le complexe avec pr55^{Gag} par immunoprécipitation (Figure 3.3). D'autres études ont aussi identifié Upfl dans le complexe avec APOBEC3G, un facteur de restriction du VIH-1¹³², indiquant qu'il peut y avoir des liens fonctionnels entre la protéine Upfl et la réplication virale. Les composantes du RNP pourraient contribuer à la restriction des cellules hôtes suite à une infection rétrovirale¹⁴³. Suite à ces résultats, nous avons voulu étudier l'effet de la modulation des niveaux intracellulaires d'Upfl sur des cellules exprimant le VIH-1.

Le résultat le plus intéressant de ce travail a permis d'identifier un nouveau rôle pour la protéine Upfl dans le métabolisme de l'ARN du VIH-1. La diminution d'Upfl par la technique de siRNA a engendré une réduction significative des niveaux de l'ARN viral et de pr55^{Gag}, même si la fonction d'Upfl dans le mécanisme NMD a été confirmée simultanément dans la même lignée cellulaire (HeLa-7C3) (Figure 3.4). Cet effet est présent dans les souches T- (Figure 3.4) et M-tropiques (Figure 3.5). Aussi, la surexpression d'Upfl augmente significativement les niveaux d'ARN du VIH-1 et de pr55^{Gag} (Figure 3.4), menant à la notion qu'Upfl est un joueur principal pour maintenir la stabilité de l'ARN du VIH-1.

La fonction d'Upf1 sur les ARNs rétroviraux est inouïe, et le rôle d'Upf1 dans la régulation de la stabilité des ARNs cellulaires est sans précédent. Plusieurs études tendent à prouver l'importance d'Upf1. Par exemple, Upf1 a été établie comme étant primordiale dans la stabilité des ARNs contenant un CPT ou non ^{101,144}. De plus, une étude récente a également identifié un rôle pour Upf1 dans la dégradation de l'ARN de l'histone H2A ¹³¹.

Nos résultats indiquent que la dégradation de l'ARN du VIH-1 ne semble pas être due au mécanisme classique NMD qui est Upf1 dépendant. D'abord, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'ARN du VIH-1 quand les cellules HeLa ont été traitées avec un siRNA dirigé contre Upf1 (Figure 3.4 et 3.5). En second lieu, des études de notre équipe démontrent aussi que l'attachement d'Upf1 à l'ARNm du VIH-1 ne mène pas à sa dégradation (Abrahamyan, L., Mouland AJ, résultats non publiés). Troisièmement, l'introduction des CPTs dans l'ORF de *gag*, ne transforme pas l'ARN du VIH-1 en un substrat pour le mécanisme NMD, et sa dégradation n'est pas déclenchée par la présence ou l'absence d'Upf1 (Figure 3.7). Aussi, les données courantes soutiennent la notion que le NMD dépend de l'épissage et du recrutement de l'EJC (le complexe exon-jonction) ^{145,146}, indiquant que l'ARN génomique de VIH-1 ne serait pas un substrat pour NMD, ce qui est conforme à nos résultats. De plus, malgré l'évidence que les longues régions 3' non-transcrites (3'UTRs) peuvent être reconnues par le mécanisme NMD ¹⁴⁷, nos résultats démontrent que l'expression d'Upf1 protège l'ARN non épissé de la dégradation. Des travaux récents démontrent aussi que l'ordre de l'enlèvement des introns cotranscriptionnels des pre-ARNs du VIH-1 ne génère pas de substrats pour NMD ¹⁴⁸. Finalement, la surexpression du mutant transdominant négatif TDN d'Upf1 (Figure 3.6), qui n'a pas d'activité NMD, agit comme le type sauvage d'Upf1 en augmentant les niveaux d'ARN du VIH-1. Toutes ces données indiquent que l'effet d'Upf1 sur l'ARN du VIH-1 est distinct et différent de celui dans le mécanisme NMD. En effet, ce n'est pas la présence d'Upf1, mais son absence qui affecte négativement les niveaux d'ARN du VIH-1 tandis que sa surexpression augmente significativement ces niveaux.

D'autres mutants d'Upf1 comprenant des délétions dans les terminaux N et C n'augmentent pas l'ARN du VIH-1 (Figure 3.12). Comme ces régions peuvent être celles qui sont importantes pour les interactions entre Upf1 et l'ARN, incluant les séquences d'instabilité^{100,106,109}, ces résultats suggèrent que ces régions soient essentielles pour la fonction d'Upf1 dans la régulation de l'ARN du VIH-1.

Upf1 est principalement cytoplasmique, mais elle transite aussi entre le noyau et le cytoplasme^{103,104}. Elle interagit directement avec l'ADN polymérase, s'associe à la chromatine et joue un rôle dans la réparation d'ADN, ce qui soutient la présence d'Upf1 dans le noyau^{111,112,119}. Nos résultats soutiennent fortement une fonction nucléaire d'Upf1 en raison de l'effet de la diminution de ses niveaux intracellulaires sur l'ARN génomique, qui reste confiné au noyau. Nos résultats suggèrent qu'Upf1 est nécessaire pour les étapes tardives de l'expression des gènes du VIH-1 (juste après la transcription) pour protéger les ARNs contre la dégradation. Dans ce cas-ci, quand nous exprimons le provirus Rev- avec le traitement siUpf1, nous observons que l'ARN génomique de 9kb est sélectivement visé, alors que celui de 2kb, qui est constitutivement et rapidement exporté hors du noyau, ne l'est pas (Figure 3.10). Cela suggère que l'activité nucléaire d'Upf1 prend place alors que la décision d'épissage est prise, en même temps ou en amont de l'activité de Rev. Ces résultats suggèrent que les séquences agissant en *cis* sur l'ARN sont nécessaires pour les effets obtenus lors de la déplétion d'Upf1 et l'insensibilité des ARNs 2kb à Upf1 est expliquée par le fait que ces ARNs ne contiennent pas de séquences CRS/INS seulement présentes sur les ORFs *gag*, *pol* et *env*.

Les protéines Upf ont également une fonction dans la traduction, par exemple dans le changement de cadre de lecture chez la levure et les cellules de mammifères¹¹³, dans la suppression de l'arrêt de la traduction des codons de terminaison normaux¹⁴⁷, dans le transport des ARNm vers une voie de dégradation de l'ARN¹⁴⁷ et dans l'augmentation de la traduction suite à leur attachement à un ORF¹³⁴. Les résultats montrés ici soutiennent un rôle pour Upf1 dans la surrégulation de la traduction de l'ARNm de *gag*. Nos résultats le démontrent par le manque de

correspondance entre les niveaux d'expression de pr55^{Gag} et de l'ARN du VIH-1 dans des conditions où les niveaux d'Upf1 ont été restaurés par le vecteur insensible au siRNA, Flag-Upf1R (Rescue) (Figure 3.8 et 3.9). Le fait que les niveaux d'ARNs ne peuvent pas être récupérés montre qu'Upf1 agit et fonctionne à un instant spécifique vers la fin des étapes d'expression, et l'effet négatif dû à l'épuisement d'Upf1 ne peut pas être restauré parce que la transcription du VIH-1 a déjà dépassé son apex. Toutefois, la surexpression d'Upf1 maintient toujours une influence marquée sur la traduction de l'ARNm de *gag*. Le mécanisme par lequel Upf1 augmente les niveaux de synthèse de pr55^{Gag} n'est pas clair. Ce pourrait être dû à l'association d'Upf1 à des séquences présentes dans l'ORF, puisque l'attachement de plusieurs facteurs NMD, dont Upf1, engendre une surrégulation de la traduction¹³⁴. L'augmentation de la traduction pourrait également être due au recyclage des ribosomes et à l'efficacité de terminaison de la traduction^{116,133,134}. Nous avons néanmoins éliminé des effets du siUpf1 sur le changement de cadre de lecture programmé du VIH-1 (Résultats non montrés), ce qui est conforme aux résultats publiés¹⁴⁹. La récupération presque complète de l'expression de pr55^{Gag} indique qu'Upf1 est aussi un régulateur principal de la synthèse des protéines virales. D'ailleurs, ces résultats renforcent la notion qu'Upf1 joue des rôles distincts dans la dégradation de l'ARN du VIH-1 et lors la traduction.

Il est intrigant qu'Upf1 ait des rôles dans la stabilité de l'ARN du VIH-1 et dans la traduction, et semble agir respectivement sur des événements en amont (dans le noyau) et en aval (augmente la traduction dans le cytoplasme). Il est tentant de spéculer qu'Upf1 peut initialement agir au niveau de l'exosome nucléaire en empêchant les ARNs contenant des introns, comme l'ARN génomique et celui de 4kb, d'être reconnus comme aberrants. L'exosome nucléaire est un complexe de surveillance de l'ARN qui accompagne la transcription et fait concurrence à la machinerie d'épissage pour les ARNs non épissés (qui contiennent des introns) afin de les dégrader¹⁵⁰. Puisque l'export des ARNs Rev dépendants du VIH-1 du noyau est également déterminée co-transcriptionnellement^{151,152}, nous spéculons que ce mécanisme de contrôle nucléaire et la décision d'exportation pourraient être couplés

au sein du VIH-1 où par lequel le VIH-1 dévie de ce mécanisme de contrôle nucléaire en employant les fonctions inhérentes d'Upf1. Nos résultats suggèrent qu'Upf1 agit pour prévenir la dégradation des ARNs du VIH-1 contenant des introns en les protégeant et en empêchant le recrutement des machineries de dégradation à l'ARN du VIH-1 ¹⁵³. Ceci pourrait permettre aux ARNs du VIH-1 de dévier la machinerie de dégradation nucléaire de l'exosome, dans le contexte Rev + et Rev-. Upf1 pourrait bloquer la fonction des machineries de dégradation d'ARN dans le contexte d'un RNP en protégeant l'ARN, mais lorsqu'il y a épuisement du niveau intracellulaire d'Upf1 dans les cellules, les ARNs du VIH-1 contenant des introns (9kb et 4kb) sont détectés et rapidement dégagés. De plus, Upf1 interagit directement avec plusieurs composants de la machinerie nucléaire et cytoplasmique de l'exosome ^{129,130} et les localisent aux 'Processing-bodies' (P-bodies) ¹⁵⁴, fournissant un appui pour ce modèle.

Nos résultats démontrent pour la première fois que la protéine cellulaire Upf1 a des fonctions dans le maintien de la stabilité de l'ARN génomique du VIH-1, et établissent un lien fonctionnel entre l'expression d'Upf1 et celui du VIH-1.

4.2 Modèle proposé

En analysant tous les résultats obtenus au cours de cette étude, nous proposons un modèle (Figure 4.1) décrivant le rôle d'Upf1 au sein du VIH-1.

Suite à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte, la transcription débute. Tel que mentionné auparavant, la protéine Tat est le facteur de transactivation de la transcription. Au début de la transcription, Tat n'est pas présente, mais il y a suffisamment de transcription pour générer des transcrits pleine longueur. Ces transcrits sont multi-épissés et diffusent librement du noyau au cytoplasme. Dans le cytoplasme, les protéines virales Tat, Rev et Nef sont produites.

Tat et Rev retournent au noyau, où Tat débute son rôle de transactivation de la transcription.

La quantité minimale d'Upfl présente dans le noyau est suffisante pour stabiliser l'ARN non et mono-épissé. Comme nos résultats démontrent qu'il y a une sélectivité entre les ARNs contenant des introns (9kb et 4kb) et non pour les ARNs multi-épissés, nous spéculons qu'Upfl interagit avec des séquences qui se trouvent sur ces deux espèces d'ARN. Ces deux types d'ARN contiennent des séquences d'instabilité (INS/CRS) dans les gènes *gag*, *pol* et *env*. Nous pensons qu'Upfl se lie à ces régions et leur confère leur stabilité.

Lorsque les niveaux de Rev arrivent à un certain point dans le noyau, l'épissage est arrêté et il y a alors transport nucléocytoplasmique des ARNs Rev-dépendants. Le transport des ARNs pleine longueur et mono-épissés est médié par la voie CRM1. De plus, des études proposent qu'Upfl transite entre le noyau et le cytoplasme *via* CRM1. Durant ce transport nucléocytoplasmique, Upfl interagit d'avantage avec ces deux espèces d'ARN et les stabilise. Dans le cytoplasme, deux choses arrivent. Premièrement, Upfl augmente la traduction des ARNs par le recyclage des ribosomes et/ou par l'efficacité de la terminaison de la traduction. Deuxièmement, Upfl stabilise ces ARNs et, dû au fait qu'elle est liée à eux, Upfl est encapsidée dans les particules virales.

De plus, comme nos résultats suggèrent des rôles distincts pour Upfl dans la stabilisation des ARNs et la traduction, nous pensons que la liaison d'Upfl aux ARNs dans le noyau peut favoriser leur stabilité. Ainsi, durant l'export du noyau au cytoplasme, Upfl interagit d'avantage avec les ARNs grâce à leur transport CRM1-dépendant et cette liaison est importante pour la stimulation de la traduction.

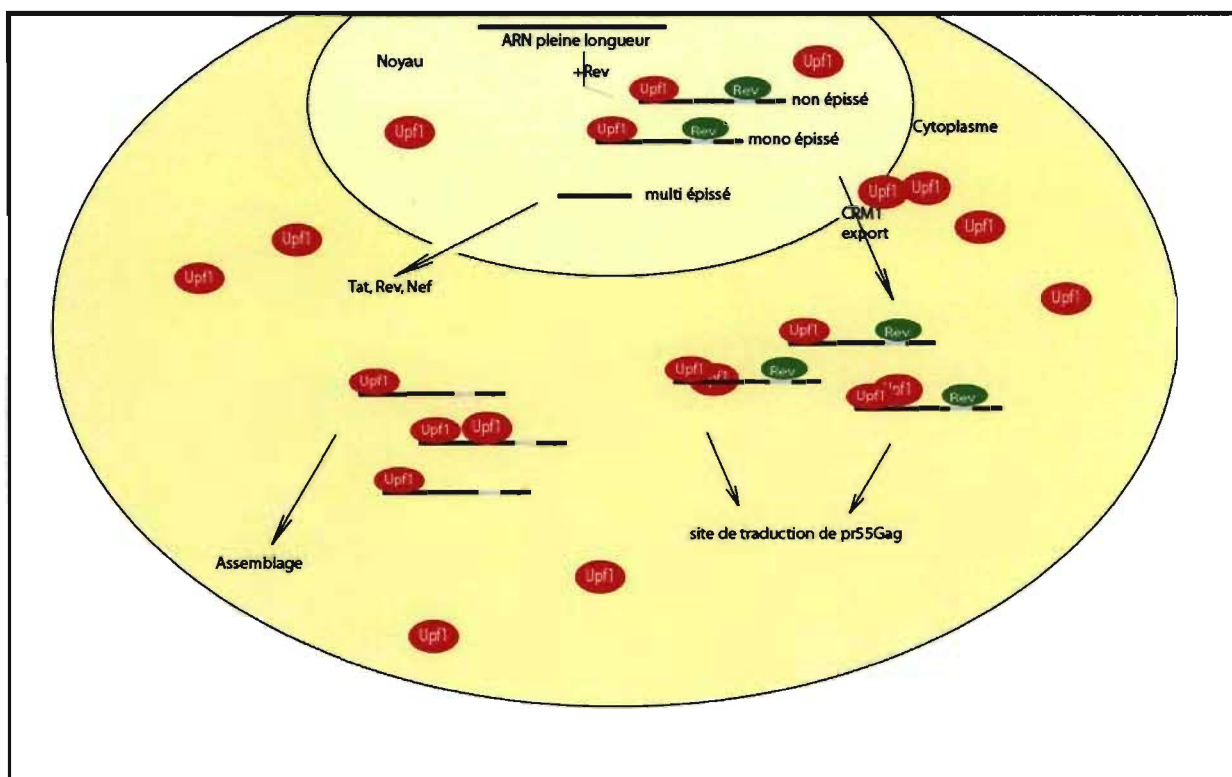


FIGURE 4.1: Modèle proposé du rôle d'Upf1 au sein du cycle de réplication du VIH-1. Suite à l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte, la transcription débute. Même si Tat n'est pas présente, il y a assez de transcription pour générer les ARNs pleines longueurs qui sont multi-épissés. La petite quantité d'Upf1 dans le noyau est suffisante pour lier les ARNs génomiques et ceux de 4kb et leur conférer leur stabilité. Les ARNs multi-épissés diffusent dans le cytoplasme et les protéines virales Tat, Rev et Nef sont synthétisées. Rev retourne dans le noyau et transporte les ARNs 9kb et 4kb par la voie CRM1-dépendante. Durant ce transport, Upf1 se lie d'avantage et augmente leur stabilité. Dans le cytoplasme, la présence d'Upf1 augmente la synthèse de pr55^{Gag}. Voir le texte pour plus de détails.

4.3 Perspectives

Afin de mieux comprendre le rôle d'Upfl dans la réplication du VIH-1, certaines expériences devront être réalisées.

Premièrement, il faudra mesurer la stabilité de l'ARN génomique lorsque l'expression d'Upfl est modulée par siUpfl et lors de la surexpression d'Upfl. Suite à la transfection, les cellules seront traitées avec DRB pour bloquer la transcription. Nous préférons utiliser DRB et non l'actinomycine D ¹⁵⁷, puisque des études ont démontré que le traitement avec l'actinomycine D durant l'expression du VIH-1 engendre la redistribution d'ARN dans le cytoplasme et peut augmenter leur traduction ¹⁵⁷. Suite au traitement avec DRB, les cellules seront collectées à différents points. L'analyse protéique et de l'ARN génomique sera faite par Western et Northern Blot respectivement. Cela confirmera le rôle d'Upfl dans la stabilisation de l'ARN génomique.

Des expériences seront aussi conduites pour valider si Upfl interagit avec les séquences d'instabilité (INS/CRS) sur l'ARN. Nous allons exprimer des provirus mutés dans les gènes *gag*, *pol* et *env*. Ces mutants seront exprimés en présence des siRNAs siNS ou siUpfl, et lors de la surexpression d'Upfl. Cette expérience nous aidera à déterminer l'identité des séquences CRS/INS auxquelles Upfl se lie pour conférer cette stabilité.

Une troisième expérience sera de voir si l'exosome nucléaire entre en jeu ou non durant la diminution d'Upfl, et si c'est ce mécanisme qui déclenche la dégradation des ARNs en absence d'Upfl. Les protéines centrales de ce mécanisme de contrôle sont PMScl 100 et PMScl 75. Les cellules HeLa seront transfectées avec les siRNAs contre PMScl 100 et 75, en présence ou en absence du siRNA contre Upfl. Si ce mécanisme est en jeu, il y aura une augmentation des niveaux d'ARN génomique, en absence de l'un ou l'autre de ces protéines, car le mécanisme sera alors défectueux et ne pourra pas les dégrader. De plus, en diminuant le niveau d'Upfl avec la diminution de l'une ou l'autre de ces protéines, nous aurons une

augmentation des niveaux d'ARN génomique, car même si Upfl est réduite, le mécanisme sera encore défectueux parce que les protéines centrales sont absentes.

Une autre expérience visera à caractériser l'effet d'Upfl dans les T lymphocytes. Ainsi, des cellules Jurkat chroniquement infectées avec le VIH-1 seront transfectées avec les siRNA siNS et siUpfl. Cela permettra de voir si la diminution du taux intracellulaire d'Upfl diminuera les niveaux viraux chez les patients qui sont séropositifs pour le VIH.

On pourrait aussi étudier la colocalisation entre Upfl et/ou l'ARN génomique et/ou pr55^{Gag} en utilisant un microscope confocal. De plus, la technique de BRET ('Bioluminescence Resonance Energy Transfer') peut être employée pour identifier une interaction entre Upfl et l'ARN génomique et pr55^{Gag}.

Ce travail a permis d'identifier des fonctions inattendues d'Upfl dans le maintien de l'expression des gènes viraux, au niveau de la stabilisation de l'ARN du VIH-1, et au niveau de la synthèse des protéines virales. Étant donné que nos résultats indiquent qu'Upfl pourrait jouer un rôle dans la stabilité et la traduction de l'ARN génomique, peut-être, pourra-t-on développer des petites molécules pouvant bloquer cette interaction. Les protéines du mécanisme NMD représentent des cibles thérapeutiques potentielles pour corriger certaines maladies génétiques¹⁵⁵. Dans le cas du VIH-1, cibler Upfl pourrait potentiellement diminuer les niveaux d'ARN viral et ralentir la réplication du VIH-1.

LISTE DE RÉFÉRENCES

1. Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1981. 30:250-2.
2. Merson MH. 2006. The HIV-AIDS pandemic at 25--the global response. N Engl J Med 354(23):2414-2417.
3. UNAIDS and WHO. 2005. AIDS Epidemic Update.
4. Levy JA. 2006. HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research. Adv Dent Res 19(1):10-16.
5. Barré-Sinoussi F., Chermann JC., Rey F., Nugeyre MT., Chamaret S., Gruest J., Dauquet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220 (4599):868-871.
6. Gallo RC., Salahuddin SZ., Popovic M., Shearer GM., Kaplan M., Haynes BF., Palker TJ., Redfield R., Oleske J., Safai B., et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 224(4648):500-503.
7. Coffin J., Haase A., Levy JA., Montagnier L., Oroszlan S., Teich N., Temin H., Toyoshima K., Varmus H., Vogt P., et al. 1986. Human immunodeficiency viruses. Science 232(4751):697.
8. Clavel F., Guetard D., Brun-Vezinet F., Chamaret S., Rey MA., Santos-Ferreira MO., Laurent AG., Dauquet C., Katlama C., Rouzioux C., et al. 1986. Isolation of a new retrovirus from West African patients with AIDS. Science 233(4761):343-6.
9. Whittle, H., Morris J., Todd J., Corrah R., Sabally S., Bangali J., Ngom PT., Rolfe M., Wilkins A. 1994. HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients. Aids 8(11):1617-20.
10. Pope M., Haasse AT. 2003. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. Nat Med 9(7):847-52.

11. Stekler J., Collier AC. 2004. Primary HIV Infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 1(2): p. 68-73.
12. Kahn JO., Walker BD. 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 339(1): p. 33-9.
13. Ioannidis J., Wilkinson D. 2003. HIV: opportunistic infections. *Clin Evid* (9):795-816.
14. Gonzalez-Scarano F., Martin-Garcia J. 2005. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* 5(1):69-81.
15. Fauci AS. 2003. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat Med* 9(7):839-843.
16. Pomerantz RJ, Horn DL. 2003. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med* 9(7):867-73.
17. Mansky LM., Temin HM. 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* 69(8):5087-94.
18. Chen LF., Hoy J., Lewin SR. 2007. Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. *Med J Aust* 186(3):146-51.
19. Zhu P., Chertova E., Bess J Jr., Lifson JD., Arthur LO., Liu J., Taylor KA., Roux KH. 2003. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(26):15812-7.
20. Lu M., Blacklow SC., Kim PS. 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* 2(12):1075-82.
21. Coffin JM., Wong ML., Varmus HE. 1997. *Retrovirus*, New York.
22. Frankel AD, Young JA. 1998. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67:1-25.
23. Turner BG, Summers MF. 1999. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285(1): 1-32.
24. Freed, E.O. 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26(1-6):13-33.
25. Peterlin, B.M., Trono D. 2003. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 3(2): p. 97-107.

26. Jacks, T., Power MD., Masiarz FR., Luciw PA., Barr PJ., Varmus HE. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331(6153):280-3.
27. Cullen BR. 1998. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93(5):685-92.
28. Doms RW., Peiper SC. 1997. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 235(2):179-90.
29. Mouland AJ., et al. 2005. Virus-Cell Interactions. Edited by Robert A. Meyers. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, 2nd Edition, Vol 15. pp: 423-483.
30. Cartier C., Sivard P., Tranchat C., Decimo D., Desgranges C., Boyer V. 1999. Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *J Biol Chem* 274(27):19434-40.
31. Franke EK., Yuan HE., Luban J. 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372(6504):359-62.
32. von Schwedler U., Kornbluth RS., Trono D. 1994. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15):6992-6.
33. Bouyac-Bertoia M., Dvorin JD., Fouchier RA., Jenkins Y., Meyer BE., Wu LI., Emerman M., Malin MH. 2001. HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell* 7(5):1025-35.
34. Jenkins Y., McEntee M., Weis K., Greene WC. 1998. Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol* 143(4):875-85.
35. Sherman PA., Fyfe JA. 1990. Human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherichia coli* possesses selective DNA cleaving activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(13):5119-23.

36. Komano J., Futahashi Y., Urano E., Miyaushi K., Murakami T., Matsuda Z., Yamamoto N. 2005. The interaction of HIV-1 with the host factors. *Jpn J Infec Dis* 58(3):125-30.
37. Poljak L., Batson SM., Ficheux D., Roques BP., Darlix JL., Kas E. 2003. Analysis of NCp7-dependent activation of HIV-1 cDNA integration and its conservation among retroviral nucleocapsid proteins. *J Mol Biol* 329(3):411-21.
38. Schroder AR., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker JR., Bushman F. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110(4):521-9.
39. Bushman FD. 2002. Integration site selection by lentiviruses: biology and possible control. *Curr Top Microbiol Immunol* 261:165-77.
40. Jung A., Maier R., Vartanian JP., Bocharov G., Jung V., Fischer U., Meese E., Wain-Hobson S., Meyerhans A. 2002. Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*, 418(6894):144.
41. Jordan A., Defechereux P., Verdin E. 2001. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J* 20(7):1726-38.
42. Pereira LA., Bentley K., Peeters A., Churchill MJ., Deacon NJ. 2000. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* 28(3):663-8.
43. Cullen BR. 1998. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* 249(2):203-10.
44. Wei P., Garber ME., Fang SM., Fischer WH., Jones KA. 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92(4):451-62.
45. Pomerantz RJ., Seshamma T., Trono D. 1992. Efficient Replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implication of latency. *J Virol* 66(3):1809-13.

46. Cantin R., Methot S., Tremblay MJ. 2005. Plunder and stowaways :incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *J Virol* 79(11):6577-87.
47. Reddy TR., Tang H., Xu W., Wong-Staal F. 2000. Sam68, RNA helicase A and Tap cooperate in the post-transcriptional regulation of human immunodeficiency virus and type D retroviral mRNA. *Oncogene* 19(32):3570-5.
48. Krishnan V., Zeichner SL. 2004. Alterations in the expression of DEAD-box and other RNA binding proteins during HIV-1 replication. *Retrovirology* 1(1):42.
49. Mouland, AJ., Cohen EA., DesGroseillers L. 2003. Trafficking of HIV-1 RNA: Recent Progress Involving Host Cell RNA-Binding Protein. *Current Genomics* 4:237-251.
50. Freed EO. 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251(1):1-15.
51. Ono A., et Freed EO. 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24):13925-30.
52. Spearman P., Wang JJ., Vander Heyden N., Ratner L. 1994. Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly. *J Virol* 68(5):3232-42.
53. Zhou W., Parent LJ., Wills JW., Resh MD. 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol* 68(4):2556-69.
54. Huang M., Orenstein JM., Martin MA., Freed EO. 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* 69(11):6810-8.
55. Garrus, J. E., von Schwedler UK., Pornillos OW., Morham SG., Zavitz KH., Wang HE., Wettstein DA., Stray KM., Cote M., Rich RL., Myszka DG., Sundquist WI. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107(1):55-65.

56. Debouck C., Gorniak JG., Strickler JE., Meek TD., Metcalf BW., Rosenberg M. 1987. Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24):8903-6.
57. D'Souza, V., et Summers MF. 2005. How Retroviruses Select Their Genomes. *Nature Reviews Microbiology* 3(8):643-655.
58. Dingwall C., Ernberg I., Gait MJ., Green SM., Heaphy S., Karn J., Lowe AD., Singh M., Skinner MA., Valerio R. 1989. Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(18):6925-9.
59. Baudin F., Marquet R., Isel C., Darlix JL., Ehresmann B., Ehresmann C. 1993. Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural domains. *J Mol Biol* 229(2):382-97.
60. Kleiman L. 2002. tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1. *IUBMB Life* 53(2):107-14.
61. Charneau P., Alizon M., et Clavel F. 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* 66(5):2814-20.
62. Charneau P. et Clavel F. 1991. A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. *J Virol* 65(5):2415-21.
63. Askjaer P., Jensen TH., Nilsson J., Englmeier L., Kjems J. 1998. The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* 273 (50), 33414–33422.
64. Cochrane AW., Jones KS., Beidas S., Dillom PJ., Skalka AM., Rosen CA. 1991. Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression. *J Virol* 65(10):5305-5313.
65. Huffman KM., et Arrigo, SJ. 1997. Identification on cis-acting repressor activity within human immunodeficiency virus type 1 protease sequence. *Virology* 234(2):253-260.

66. Mikaelian I., Krieg M., Gait MJ., Karn J. 1996. Interactions of INS (CRS) elements and the splicing machinery regulate the production of Rev-responsive mRNAs. *J Mol Biol.* 257(2):246-64.
67. Schwartz S., Felber BK., Pavlakis GN. 1992. Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J. Virol* 66(1):150-159.
68. Suptawiwat O., Sutthent R., Lee TH., Auewarakul P. 2003. Intragenic HIV-1 env sequences that enhance gag expression. *Virology* 309(1):1-9.
69. Tan W., Schwartz S. 1995. The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 counteracts the effect of an AU-rich negative element in the human papillomavirus type 1 late 3' untranslated region, *J Virol.* 69(5):2932-2945.
70. Maeda M., Sawa H., Tobiume M., Tokunaga K., Hasegawa H., Ichinohe T., Sata T., Moriyama M., Hall WW., Kurata T., Takahashi H. 2006. Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. *Microbes Infect* 8(11):2647-56.
71. Schneider R., Campbell M., Nasioulas G., Felber BK., et Pavlakis GN. 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J. Virol.* 71(7):4892-4903.
72. Kotsopoulos E., Kim VN., Kingsman AJ., Kingsman SM., Mitrophanous KA. 2000. A Rev-Independent Human Immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *J. Virol* 74(10):4839-4852.
73. Nasioulas G., Zolotukhin AS., Tabernero C., Solomin L., Cunningham CP., Pavlakis GN., Felber BK. 1994. Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J Virol* 68(5):2986-93.
74. Schwartz S., Campbell M., Nasioulas G., Harrison J., Felber BK., Pavlakis GN. 1992. Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human

- immunodeficiency virus type 1 results in Rev-Independent gag expression. *J Virol* 66(12):7176-82.
75. Rosen CA., Terwilliger E., Dayton A., Sodroski JG., Haseltine WA. 1988. Intragenic cis-acting are gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci, USA* 85(7):2071-75.
 76. Wolff H., Brack-Werner R., Neumann M., Werner T., Schneider R. 2003. Integrated functional and bioinformatics approach for the identification and experimental verification of RNA signals: application to HIV-1 INS. *Nucleic Acids Research* 31(11):2839-51.
 77. Brighty D., et Rosenberg M. 1994. A cis-acting repressive sequence that overlaps the Rev responsive element of HIV-1 regulates nuclear retention of env mRNAs independently of known splice signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(18):8314–8318.
 78. Maldarelli F., Martin MA., et Strebel K. 1991. Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J. Virol.* 65(11):5732-5743.
 79. Suptawiwat O., Lee TH., Auewarakul P. 2005. HIV-1 Cis Enhancing Sequence (CES) enhances CTE-dependent Gag expression. *Virology* 342(1):111-118.
 80. Zolotukhin AS., Michalowski D., Bear J., Smulevitch SV., Traish AM., Peng R., Patton J., Shatsky IN., Felber BK. 2003. PSF acts through the Human Immunodeficiency Virus Type 1 mRNA instability elements to regulate virus expression. *Mol Cell Biol* 23(18):6618-30.
 81. Felber BK., Hadzopoulou-Cladaras M., Cladaras C., Copeland T., Pavlakis GN. 1989. Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(5):1495-99.
 82. Afonina, E., Neumann M., Pavlakis GN. 1997. Preferential Binding of Poly(A)-binding protein 1 to an inhibitory RNA element in the human immunodeficiency virus type 1 gag mRNA. *J. Biol Chem* 272(4):2307-11.

83. Macchi P., Kroening, S., Palacios, I.M., Baldassa, S., Grunewald, B., Ambrosino, C., Goetze, B., Lupas, A., St Johnston, D. and Kiebler, M. 2003. Barentsz, a new component of the Staufen containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufen in an RNA dependent manner. *J Neurosci*, 23, 5778-5788.
84. Freed EO. 2004. HIV-1 and the host cell: an intimate association. *Trends Microbiol* 12(4):170-7.
85. Palacios, I.M., Gatfield, D., St Johnston, D. and Izaurralde, E. 2004. An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, 427, 753-757.
86. Ott DE. 2002. Potential roles of cellular proteins in HIV-1. *Rev. Med. Virol* 12(6):359-374.
87. Cochrane AW., McNally MT., Mouland AJ. 2006. The retrovirus RNA trafficking granules: from birth to maturity. *Retrovirology* 3:1-18.
88. Chou C-F., Mulky A., Maitra S., Lin WJ., Gherzi R., Kappes J., Chen CY. 2006. Tethering KSRP, a Decay-Promoting AU-rich Element Binding protein, to mRNAs Elicits mRNA Decay. *Mol Cell Biol* 26(10):3695-3706.
89. Black AC., Luo J., Chun S., Bakker A., Fraser JK., Rosenblatt JD. 1996. Specific Binding of Polypurine Tract Binding Protein and hnRNPA1 to HIV-1 CRS Elements. *Virus Genes* 12(3):275-85.
90. Chatel-Chaix L., Clement JF., Martel C., Beriault V., Gatignol A., DesGroseillers L., Mouland AJ. 2004. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol* 24(7):2637-2648.
91. Mouland AJ., Mercier J., Luo M., Bernier J., DesGroseillers L., Cohen EA. 2000. The double stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence of a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol*. 74(12):5441-5451.
92. Yung E., Sorin M., Pal A., Craig E., Morozov A., Delattre O., Kappes J., Ott D., Kalpana GV. 2001. Inhibition of HIV-1 virion production by a transdominant mutant of integrase interactor 1. *Nat Med* 7(8):920-926.

93. Rose KM., Marin M., Kozak SL., Kabat D. 2004. The viral infectivity factor (Vif) of HIV-1 unveiled. *Trends Mol Med* 10(6):291-297.
94. Samuel CE. 2006. Virus-host interaction Minireview: Human immunodeficiency virus, Hepatitis C virus, and Influenza Virus. *J Biol Chem* 281(13):8305-07.
95. Najera I., Krieg M., Karn J. 1999. Synergistic stimulation of HIV-1 revdependent export of unspliced mRNA to the cytoplasm by hnRNP A1. *J Mol Biol* 285(5):1951-1964.
96. Levesque K., Halvorsen M., Abrahamyan L., Chatel-Chaix L., Poupon V., Gordon H., DesGroseillers L., Gatignol A., Mouland AJ. 2006. Trafficking of HIV-1 RNA is mediated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 and impacts on viral assembly. *Traffic* 7(9):1176-93.
97. Barreau C., Paillard L., Osborne HB. 2005. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 33(22):7138-7150.
98. Leeds P., Peltz SW., Jacobson A., Culbertson MR. (1991) The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev* 5(12A):2303-2314.
99. Perlick HA., Medghalchi SM., Spencer FA., Kendzior RJ Jr., Dietz HC. 1996. Mammalian orthologues of a yeast regulator of nonsense transcript stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(20):10928-10932.
100. Applequist SE., Selg M., Raman C., Jack HM. 1997. Cloning and characterization of HUPF1, a human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* nonsense mRNA-reducing UPF1 protein. *Nucleic Acids Res* 25(4):814-821.
101. Bhattacharya A., Czaplinski K., Trifillis P., He F., Jacobson A., Peltz SW. 2000. Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* 6(9):1226-1235.
102. Pal M., Ishigaki Y., Nagy E., Maquat LE. 2001. Evidence that phosphorylation of human upf1 protein varies with intracellular location and

- is mediated by a wortmannin-sensitive and rapamycin-sensitive PI 3-kinase-related kinase signaling pathway. *RNA* 7(1): 5-15.
103. Fasken MB., et Corbett AH. 2005. Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 12(6):482-488.
 104. Mendell JT., ap Rhys CM., Dietz HC. 2002. Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science* 298(5592):419-422.
 105. Kadlec J., Guilligay D., Ravelli RB., Cusack S. 2006. Crystal structure of the UPF2-interacting domain of nonsense-mediated mRNA decay factor UPF1. *RNA* 12(10):1817-1824.
 106. Singh G., et Lykke-Andersen J. 2006. Human Upf proteins in NMD (book chapter) *Nonsense-Mediated mRNA Decay*. Edited by Lynne E. Maquat. Eureka.com.
 107. Peltz SW., He F., Welch E. et Jacobson A. 1994. Nonsense-medaited mRNA decay in yeast. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 47:271-298.
 108. Medghalchi SM., Frischmeyer PA., Mendell JT., Kelly AG., Lawler AM., Dietz HC. 2001. Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Hum Mol Genet* 10(2):99-105.
 109. Yamashita A., Ohnishi T., Kashima I., Taya Y., Ohno S. 2001. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 15(17):2215-2228.
 110. Chiu SY., Serin G., Ohara O., Maquat LE. 2003. Characterization of human Smg5/7a: A protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1. *RNA* 9(1):77-87.
 111. Azzalin CM., Lingner J. 2006. The Human RNA Surveillance Factor UPF1 is required for S phase Progression and Genome Stability. *Curr Biol* 16(4):433-439.

112. Azzalin CM., Lingner J. 2006. The Double Life of Upfl in RNA and DNA stability pathways. *Cell Cycle* 5(14):1496-98.
113. Wilkinson MF. 2005. A new function for the nonsense-mediated mRNA decay factors. *Trends Genet* 2(3):143-148.
114. Garneau NL., Wilusz J., Wilusz CJ. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2):113-126.
115. Le HH., Izaurralde E., Maquat LE., Moore MJ. 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* 19(24):6860-6896.
116. Kashima I., Yamashita A., Izumi N., Kataoka N., Morishita R., Hoshino S., Ohno M., Dreyfuss G., Ohno S. 2006. Binding of a novel SMG-1/Upfl/eRF1/eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upfl phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 20(3):355-67.
117. Lozano F., Maertzdorf B., Pannell R., Milstein C. 1994. Low cytoplasmic mRNA levels of immunoglobulin kappa light chain genes containing nonsense codons correlate with inefficient splicing. *EMBO J* 13(19): 4617-4622.
118. Maquat LE. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2):88-89.
119. Carastro LM., Tan CK., Selg M., Jack HM., So AG., Downey KM. 2002. Identification of delta helicase as the bovine homolog of HUPF1: demonstration of an interaction with the third subunit of DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Res* 30(10):2232-2243.
120. Kim YK., Furic L., DesGroseillers L., Maquat LE. 2005. Mammalian Staufen recruits Upfl to specific mRNAs 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120(2):195-208.
121. Sun X., Perlick HA., Dietz HC., Maquat LE. 1998. A mutated human homologue to yeast Upfl protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17):10009-10014.

122. Hall GW., et Thein S. 1994. Nonsense codon mutations in the terminal exon of the beta-globin gene are not associated with a reduction in beta-mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant beta-thalassemia. *Blood* 83(8):2031-2037.
123. Barker GR., et Beemon K. 1991. Nonsense codons within the Rous Sarcoma virus gag gene decrease the stability of unspliced viral RNA. *Mol Cell Biol* 11(5):2760-68.
124. Leblanc JJ., et Beemon KL. 2004. Unspliced Rous Sarcoma virus genomic RNAs are translated and subjected to nonsense-mediated mRNA decay before packaging. *J. Virol* 78(10):5139-5146.
125. Weil JE., et Beemon KL. 2006. A 3'UTR sequence stabilizes termination codons in the unspliced RNA of Rous sarcoma virus. *RNA* 12(1):102-10.
126. Behm-Ansmant I., et Izaurralde E. 2006. Quality control of gene expression: a stepwise assembly of the surveillance complex that triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 20(5):391-398.
127. Eulalio A., Behm-Ansmant I., Izaurralde E. 2007. P-bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 9-22.
128. Banihashemi L., Wilson GM., Das N., Brewer G. 2006. Upf1/Upf2 Regulation of 3' Untranslated Region Splice Variants of AUF1 Links Nonsense-Mediated and A+U=Rich Element-Mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* 26(23):8743-54.
129. Lejeune F., Li X., Maquat LE. 2003. Nonsense-Mediated mRNA Decay in Mammalian Cells Involves Decapping, Deadenylation, and Exonucleolytic Activities. *Mol Cell* 12(3):675-87.
130. Lehner B., et Sanderson CM. 2004. A Protein Interaction Framework for Human mRNA Degradation. *Genome Res* 14(7):1315-1323.
131. Kaygun H., et Marzluff WF. 2005. Regulated degradation of replication-dependent histone mRNAs requires both ATR and Upf1. *Nat Struct Mol Biol* 12(9):794-800.

132. Kozak SL., Marin M., Rose KM., Bystrom C., Kabat D. 2006. The Anti-HIV-1 Editing Enzyme APOBEC3G Binds HIV-1 RNA and Messenger RNAs that Shuttle Between Polysomes and Stress Granules. *J Biol Chem* 281(39):29105-19.
133. Barker KE., et Parker R. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 16(3):293:299.
134. Nott A., Le Hir H., Moore MJ. 2004. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev* 18(2):210-222.
135. Carter MS., Doskow J., Morris P., Li S., Nhim RP., Sandstedt S., Wilkinson MF. 1995. A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-Cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J. Biol Chem* 270(48):28995-29003.
136. Sadaie MR., Benter T., Wong-Staal F. 1988. Site-directed mutagenesis of two trans-regulatory genes (tat-III, trs) of HIV-1. *Science*, 239(4842): 910-913.
137. Poon DT., Chertova EN., et Ott DE. 2002. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preferentially Encapsidates Genomic RNAs That Encode Pr55(Gag): Functional Linkage between Translation and RNA Packaging. *Virology* 293(2):368-378.
138. Gehring NH., Neu-Yilik G., Schell T., Hentze MW., Kulozik AE. 2003. Y14 and hUPF3b form an NMD-activating complex. *Mol Cell* 11(4):939-949.
139. Gottlinger HG., Dorfman T., Sodroski JG., Haseltine WA. 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(8):3195-3199.
140. Mouland AJ., Coady M., Yao XJ., Cohen ÉA. 2002. Hypophosphorylation of Poly(A) Polymerase and Increased Polyadenylation Activity are Associated with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Expression. *Virology* 292(2):321-330.

141. Beriault V., Clement JF., Levesque K., Lebel C., Yong X., Chabot B., Cohen EA., Cochrane AW., Rigby WF., Mouland AJ. 2004. A late role for the association of hnRNP A2 with the HIV-1 hnRNP A2 response elements in genomic RNA, Gag, and Vpr localization. *J Biol Chem* 279(42):44141-44153.
142. Muhlemann O., Mock-Casagrande CS., Wang J., Li S., Custodio N., Carmo-Fonseca M., Wilkinson MF., Moore MJ. 2001. Precursor RNAs Harboring Nonsense codons accumulate near the site of transcription. *Mol Cell* 8(1):33-43.
143. Goff SP. 2004. Retrovirus restriction factors. *Mol Cell* 16(6):849-859.
144. He F., et Jacobson A. 2001. UPF1p, Nmd2p, and UPF3p regulate the decapping and exonucleolytic degradation of both nonsense-containing mRNAs and wild-type mRNAs. *Mol Cell Biol* 21(5):1515-1530.
145. Maquat LE., et Li X. 2001. Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA* 7(3):445-456.
146. Zhang J., Sun X., Qian Y., Maquat LE. 1998. Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA* 4(7):801-815.
147. Muhlrad D., et Parker R. 1999. Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. *RNA* 5(10):1299-1307.
148. Bohne J., Wodrich H., et Krausslich HG. 2005. Splicing of human immunodeficiency virus RNA is position-dependent suggesting sequential removal of introns from the 5' end. *Nucleic Acids Res* 33(3):825-837.
149. Harger JW., et Dinman JD. 2004. Evidence against a direct role for the Upf proteins in frameshifting or nonsense codon readthrough. *RNA* 10(11):1721-1729.

150. Andrulis ED., Werner J., Nazarian A., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Lis JT. 2002. The RNA processing exosome is linked to elongating RNA polymerase II in *Drosophila*. *Nature* 420(6917):837-841.
151. Seguin B., Staffa A., et Cochrane A. 1998. Control of human immunodeficiency virus type 1 RNA metabolism: role of splice sites and intron sequences in unspliced viral RNA subcellular distribution. *J Virol* 72(12):9503-9513.
152. Iacampo S. et Cochrane A. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Rev function requires continued synthesis of its target mRNA. *J Virol* 70(12):8332-8339.
153. Lykke-Andersen J., et Wagner E. 2005. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev* 19(3):351-361.
154. Sheth, U., et Parker R. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300(5620):805-808.
155. Kuzmiak HA., et Maquat LE. 2006. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 12(7): 306-16.
156. Ciaudo C., Bourdet A., Cohen-Tannoudji M., Dietz HC., Rouquelle C., Avner P. 2006. Nuclear mRNA degradation pathway(s) are implicated in Xist regulation and X chromosome inactivation. *PloS Genet* 2(6):e94.
157. Imamichi T., Conrads TP., Shou M., Liu Y., Adelsberger JW., Veenstra TD., Lane HC. 2005. A transcriptional inhibitor, actinomycin D, enhances HIV-1 replication through an interleukin-6-dependent pathway. *J Acquir Immune Defic Syndr* 40(4):388-97.

**SPRINGER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 11, 2007

This is a License Agreement between Lara Ajamian ("You") and Springer ("Springer"). Please note that you are liable to account for Value Added Tax (VAT). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

License Number	1704270915584
License date	May 08, 2007
Licensed content publisher	Springer
Licensed content publication	Somatic Cell and Molecular Genetics
Licensed content title	HIV-1 Replication
Licensed content author	Eric O. Freed
Licensed content date	Oct 25, 2004
Volume number	26
Issue number	1
Pages	13 - 33
Type of Use	Thesis / Dissertation
Details of use	Print
Portion of the article	Figures
Title of your thesis / dissertation	Interactions virus-hôte: implication de la protéine cellulaire Upf1 au niveau de la régulation de l'ARN du VIH-1
Expected completion date	May 2007
Total	\$0.00

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 11, 2007

This is a License Agreement between Lara Ajamian ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

License Number	1704270006928
License date	May 08, 2007
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Microbiology
Licensed content title	How retroviruses select their genomes
Licensed content author	Victoria D'Souza, Michael F. Summers
Volume number	3
Issue number	8
Pages	643-655
Year of publication	2005
Portion used	Figures
Number of figures	2
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
High-res requested	No
PO Number	
Total	\$0.00

**OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 11, 2007

This is a License Agreement between Lara Ajamian ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Oxford University Press, and the payment terms and conditions.

License Number	1704260858833
License date	May 08, 2007
Licensed content title	Cloning and characterization of HUPF1, a human homolog of the Saccharomyces cerevisiae nonsense mRNA-reducing UPF1 protein
Licensed content author	SE Applequist, et. al.
Licensed content publication	Nucleic Acids Research
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content date	Feb 15, 1997
Type of Use	Thesis / Dissertation
Institution name	its for my Master's thesis
Title of your work	Interactions virus-hôte: implication de la protéine cellulaire Upf1 au niveau de la régulation de l'ARN du VIH-1
Publisher of your work	its for my Master's thesis
Expected publication date	may 2007
Permissions cost	\$0.00
Value added tax	\$0.00
Total	\$0.00

Yes of course. Just acknowledge the source.-Regards, Ron Landes

[Hide Quoted Text]

Hi,

I would like to know if it is possible to use one of the figures in the following book

Nonsense-Mediated mRNA Decay

Edited by: Lynne E. Maquat

ISBN: 1-58706-296-8

the following chapter: Human Upf Proteins in NMD

Chapter authors: Guramrit Singh and Jens Lykke-Andersen

for my masters thesis. The figure is the one showing Upf1 with its different domains (i.e NES, NLS, zinc fingers etc)

Thank you

Lara Ajamian

Dear Ms. Ajamian:

Thank you for your interest in our copyrighted material, and for requesting permission for its use.

Permission is granted for non-exclusive use of the material requested. Also, reference must be given in the text to the original source of the material.

Thank you for your patience while your request was being processed. If you wish to contact us further,

please use the address below.

Sincerely yours

AMBREEN IRSHAD

Permissions Billing Officer
Bentham Science Publishers Ltd

Email: permission@bentham.org

URL: www.bentham.org

FAX No.: +92 21 4971796

-----Original Message-----

From: [information retirée / information withdrawn] [mailto:[information retirée / information withdrawn]]

Sent: Thursday, May 03, 2007 6:50 AM

To: permission@bentham.org

Subject: C-Query: Permission Requests

=====[C-Query: Permission Requests]=====

Dear Ms. Ambreen Irshad ,

Please kindly look at the matter

=====

I would like to know if it is possible to use one of the figures in the following publication:

Mouland AJ, Cohen EA, DesGroseillers L. 2003. trafficking of HIV-1 RNALRecent progress involving host cell RNA-binding protein. Current genomics 4:237-251.

for my masters thesis. the figure is the HIV-1 RNA one.

Thank you

Lara Ajamian

Student